



TITLE:

# 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)バイオセンサーの生体イメージングへの展開( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

熊谷, 悠香

---

CITATION:

熊谷, 悠香. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)バイオセンサーの生体イメージングへの展開. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18423>

RIGHT:

許諾条件により本文は2015-01-06に公開; 許諾条件により要旨は2014-06-24に公開

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) バイオセンサーの  
生体イメージングへの展開

熊谷 悠香

# 目次

第一部 「二光子励起顕微鏡下で観察可能な FRET バイオセンサーの開発」 ...	8
要旨.....	9
第一章 序論.....	11
1.1 はじめに.....	12
1.2 がん.....	13
1.3 生体イメージングとがん研究.....	14
1.4 FRET バイオセンサーと二光子イメージング.....	15
1.5 FRET バイオセンサーの構造.....	16
イノシトールリン脂質バイオセンサー Pippi.....	18
Crk チロシンリン酸化検出バイオセンサー Picchu.....	20
1.6 蛍光タンパク質.....	21
第二章 実験方法・材料.....	23
2.1 FRET バイオセンサーとプラスミド.....	24
2.2 細胞と試薬.....	24
2.3 レトロウイルスによる遺伝子安定発現株の作製.....	25
2.3 蛍光スペクトルの取得.....	25
2.4 落射型蛍光顕微鏡下での観察.....	26
2.5 二光子励起顕微鏡下での観察.....	27
2.6 MDCK 細胞を用いた三次元培養法.....	28
2.7 統計解析.....	29
第三章 結果.....	30
3.1 sREACH はほとんど蛍光を発さない.....	31
3.2 sREACH を持つ FRET バイオセンサーの作製.....	32
3.3 sREACH をアクセプターにもつ FRET バイオセンサーは PI(3,4)P <sub>2</sub> に結合し FRET を起こす。.....	34

3.4	二光子励起顕微鏡下での FRET 観察において、sREACH と最も相性のいいドナーは TFP である。 .....	34
3.5	TAPP1 ドメイン R221H 変異によって Pippi バイオセンサーは PI(3,4)P <sub>2</sub> に結合しない。 .....	36
3.6	PI(3,4)P <sub>2</sub> は頂端膜ではなく壁側膜に多く局在する。 .....	37
3.7	Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーは他のイノシトールリン脂質を検出する FRET バイオセンサーにも適用可能である。 .....	38
3.8	Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーはキナーゼを検出する FRET バイオセンサーにも適用可能である。 .....	39
第四章	考察 .....	41
	アクセプター蛍光タンパク質 sREACH .....	42
	内部コントロール Keima .....	43
	ドナー蛍光タンパク質 TFP .....	44
	PI(3,4)P <sub>2</sub> を観察する意義 .....	45
	Keima-TFP-sREACH 型のバイオセンサーの応用 .....	46
	二光子励起顕微鏡下での FRET 観察 .....	46
	最後に .....	48
	謝辞 .....	50
	参考文献 .....	51
第二部	「生体 FRET イメージングを用いたマウス乳がんにおける 不均一な ERK 活性の可視化」 ....	57
	要旨 .....	59
第一章	序論 .....	60
1.1	はじめに .....	61
1.2	がん幹細胞 .....	62
1.3	乳がん .....	63
1.4	FRET バイオセンサーと二光子 FRET イメージング .....	63
1.5	FRET バイオセンサー発現遺伝子改変マウス (FRET マウス) .	65

1.6	MMTV-Neu マウス .....	66
第二章	材料と方法 .....	68
2.1	マウス .....	69
2.2	顕微鏡と画像解析.....	69
2.3	乳腺、乳がんの生体観察 .....	70
2.4	乳がん細胞の一細胞単離 .....	70
2.5	FRET 値に基づく細胞分取 .....	71
2.6	細胞表面抗原を用いた解析 .....	72
2.7	in vitro tumorsphere 形成実験.....	72
2.8	in vivo 移植実験.....	72
2.9	組織免疫染色、ウェスタンブロット .....	73
2.10	クラスター解析 .....	73
第三章	結果 .....	74
3.1	マウス HER2 陽性乳がんにおいて ERK 活性は不均一である。 .	75
3.2	MEK 阻害剤の影響は ERK 活性の高い細胞で顕著である。 .....	78
3.3	ERK 活性の高いがん細胞は tumorsphere 形成能が低く、がん幹細胞 マーカーの発現が低い。 .....	81
第四章	考察 .....	87
	FRET バイオセンサー発現遺伝子改変マウス（FRET マウス）の有用性	88
	原発性乳がん P0 と移植乳がん P1 の ERK 活性分布の違い .....	89
	in vivo FRET イメージングの有用性 .....	90
	ERK と乳がん幹細胞性の制御.....	91
	抗がん剤としての MEK 阻害剤.....	92
	最後に .....	94
	謝辞.....	95
	参考文献 .....	96



## 要旨

がんは過去 10 年に渡り、日本人の死亡原因第一位を占めている。がん遺伝子産物を標的とする新規抗がん剤が開発され予後の改善をもたらしているものの、多くのがんについては根治的治療が未だ見つかっていない。近年、単クローン由来のがん細胞集団に **heterogeneity** が存在することなど培養皿上のがん細胞と生体内のがん細胞の間にはさまざまな違いがあることが明らかにされてきた。がんの根治的治療を目指すためには、生体により近い三次元環境や生体内における細胞がん化機構の解析をし、がんの特性を理解することが必要である。

### 第一部「二光子励起顕微鏡下で観察可能な FRET バイオセンサーの開発」

生体におけるがん細胞の特性を理解するために、がん細胞の分子活性を生体観察することが有用であると考え、「二光子励起顕微鏡下で観察可能な FRET (Förster Resonance Energy Transfer) バイオセンサー」を作製した。二光子励起顕微鏡は生体深部の観察を可能とする。一方、FRET バイオセンサーは生きた細胞内の分子活性を観察することを可能とする。これら二つの技術を組み合わせることで「生体内で分子活性を観察すること」が可能となる。しかし、二光子励起法は励起帯域が広いため、従来のドナー、アクセプターを持つ FRET バイオセンサーではドナー励起でアクセプターが強く励起されてしまい（交叉励起）、正確な FRET 値を得ることができないという問題があった。そこで本研究ではアクセプター交叉励起の影響を軽減するため、「ドナーの蛍光減弱のみで FRET を観察する FRET バイオセンサー」を作製した。量子効率のきわめて低い蛍光タンパク質である **sREACH** をアクセプターに用い、**CFP** あるいは **TFP** をドナー蛍光タンパク質に用いることでこれを可能とした。内部標準として赤色蛍光タンパク質 **Keima** を N 末端に融合し、**PI(3,4)P<sub>2</sub>** を検出する二光子用

FRET バイオセンサーを作製した。このバイオセンサーを用い①従来の落射型蛍光顕微鏡下観察が可能なこと、②二光子励起顕微鏡下での観察が可能なこと、③生体に近い三次元管腔構造を形成するイヌ腎臓上皮細胞（MDCK）細胞で PI(3,4)P<sub>2</sub> の局在を観察できること、④二光子用 FRET バイオセンサー骨格が他のイノシトールリン脂質観察バイオセンサーにも応用可能であること、⑤二光子用 FRET バイオセンサー骨格が構造の異なるキナーゼ検出用バイオセンサーにも応用可能であることを示した。本研究の成果は二光子励起顕微鏡下で FRET を観察する一つの手段を示しており、生体 FRET イメージングへの一歩となることが期待される。

## 第二部「生体 FRET イメージングを用いたマウス乳がんにおける不均一な ERK 活性の可視化」

種々の技術進歩から、筆者の所属する研究室では FRET バイオセンサーを発現する遺伝子改変マウス（FRET マウス）の作出に成功した。筆者は ERK 活性を観察する FRET バイオセンサーを発現する Eisuke マウスと HER2 陽性乳がんを高率に発症する MMTV-Neu マウスを交配し、HER2 陽性原発性乳がんにおける ERK 活性を二光子励起顕微鏡下で生体観察した。原発性乳がんは不均一な ERK 活性分布を示しているが、各細胞の ERK 活性は 6 時間にわたりほぼ変動しなかった。MEK 阻害剤 PD0325901 と EGFR、HER2 阻害剤ラパチニブをそれぞれマウスに処理した際、定常状態で ERK 活性の高い細胞は低い細胞に比べ顕著に ERK 活性を下げた。また、ERK 活性の高い細胞、低い細胞をフローサイトメトリーにより分取した所、ERK 活性の高い細胞に比べ低い細胞は tumorsphere 形成能、乳がん形成能、幹細胞マーカー発現レベルが高いことが明らかになった。正常乳腺細胞株を用い MEK 阻害剤添加により ERK 活性を抑制した所、幹細胞マーカー（CD24、CD61）の発現が上昇することが確認され



た。以上から、ERK が幹細胞マーカー（CD24、CD61）の発現を制御し、がん細胞において低いERK活性が保たれることが幹細胞性を維持するために必要であることが示唆された。

## 第一部

「二光子励起顕微鏡下で観察可能な FRET バイオセンサーの開発」

## 要旨

がんは日本人の死亡原因第一位を占める。がん遺伝子産物を標的とする新規抗がん剤が開発され予後の改善をもたらしているものの、多くのがんについては根治的治療が未だ見つかっていない。近年、単一クローン由来のがん細胞集団に **heterogeneity** が存在することなど、ディッシュ上で培養されたがん細胞と組織内のがん細胞との間にはさまざまな違いがあることが明らかにされてきた。がんの根治的治療を目指すためには、より生体に近い三次元環境、あるいは生体内における細胞がん化機構の解析をし、生体におけるがんの特性を理解することが必要である。

筆者は生体におけるがん細胞の生物学的特性を可視化することを最終目標に、本研究においてそれを可能とするツール「二光子励起顕微鏡下で観察可能な **FRET (Förster Resonance Energy Transfer)** バイオセンサー」を作製した。二光子励起顕微鏡は生体深部の観察に近年多用されている。**FRET** とは励起状態にあるドナー蛍光タンパク質から、アクセプター蛍光タンパク質へエネルギーが無放射遷移する現象を指す。**FRET** バイオセンサーにおいては、このエネルギー遷移効率を測定することで、目的分子の活性を測定することができる。二光子励起顕微鏡下で **FRET** を観察することで、生体における目的分子の活性をリアルタイムに観察することが可能となる。しかし大きな問題として、従来の二光子励起顕微鏡では二光子励起法による広範囲な励起スペクトル特性により、ドナータンパク質だけでなく、アクセプタータンパク質も直接励起されてしまい、結果的に **FRET** 検出感度が低くなる、という技術的な欠点があった。この問題を解決するため、筆者はアクセプターを量子効率の低い蛍光タンパク質 **sREACH (super resonance energy accepting chromoprotein)** にし、ドナーの蛍光減弱により **FRET** を定量する新規 **FRET** バイオセンサーを作製すること

とした。作製した  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  を検出する FRET バイオセンサーは内部標準として赤色蛍光タンパク質 **Keima** を持ち、ドナー蛍光タンパク質として **Teal fluorescent protein (TFP)** をもつ。この新規バイオセンサーが二光子励起顕微鏡下で観察可能であることを示すため、筆者は **EGF** 刺激に対する  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  の産生とマトリゲル内で三次元培養したイヌの腎臓上皮細胞 **MDCK** 細胞における  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  の局在を観察した。さらに作製した新規 FRET バイオセンサー骨格が他のイノシトールリン脂質検出 FRET バイオセンサーだけでなく、構造の異なる FRET バイオセンサーにも応用可能であることを示した。

本研究における成果は、二光子励起顕微鏡下で FRET 観察を可能とする一つの手法を確立したことにある。この成果が二光子励起顕微鏡下における生体 FRET イメージング実現に貢献することを期待する。

## 第一章 序論

## 1.1 はじめに

がんは過去 20 年以上にわたり日本人の死因の第一位を占めている。近年、がん遺伝子産物を標的とする新規抗がん剤が開発され、予後の改善をもたらしてはいるものの、多くのがんについては根治的治療が未だ見つかっておらず、新たな薬剤の開発が求められている。そしてそのためには、がんの細胞生物学的特性をより深く理解することが必要となる。これまでのがん生物学研究を鑑みると、がん遺伝子の発見に代表される細胞がん化機構の多くは、培養細胞を用いた研究により明らかにされたものである。しかし近年、ディッシュ上で培養されたがん細胞と組織内のがん細胞との間にはさまざまな違いがあることが明らかにされてきた。例えば、マクロファージや繊維芽細胞などの正常細胞とがん細胞がなす相互作用の存在とその意義が明らかにされつつあること、単クローン由来のがん細胞集団に **heterogeneity** が存在すること、がん幹細胞の存在とその維持のための **niche** が存在すること、などが挙げられる[1, 2]。従って、がん細胞の特性を理解するためには、より生体に近い三次元環境、あるいは生体内における細胞がん化機構の解析が必要である。

生体内における細胞がん化機構を解析するために、生体におけるがん細胞の生物学的特性を可視化することが有用である。これを実現するために筆者は、二光子励起顕微鏡と **FRET (Förster Resonance Energy Transfer)** の原理に基づくバイオセンサー技術とを用いることにした。二光子励起顕微鏡は近年、生体深部組織でのイメージングに用いられており、組織深部を高感度にイメージングが可能であり、低い光毒性を持つなどの優れた特性も有している[3]。一方、**FRET** バイオセンサーは、細胞内におけるタンパク質-タンパク質間の相互作用やキナーゼの活性を時空間的に可視化する際に用いられている[4]。**FRET** は励起状態にあるドナー蛍光タンパク質から、アクセプター蛍光タンパク質へエ

エネルギーが無放射遷移する現象を指す。**FRET** バイオセンサーとは、このエネルギー遷移効率を測定することで、目的分子の活性を測定することができるようにデザインされたものである。従って、この二つの手段を組み合わせることで、生きた組織や三次元培養細胞において、がん遺伝子情報伝達系の活性化状態を可視化でき、細胞がん化機構がより詳細に明らかになると期待される。

しかしこの二つの組み合わせには一つ大きな問題があった。励起スペクトルに相当する二光子吸収断面積は、単光子の励起スペクトルよりも半値幅が広く、ドナータンパク質の励起により、アクセプタータンパク質も直接励起する、いわゆる交叉励起が大きくなり、結果的に **FRET** のシグナルノイズ比が低くなるという技術的な欠点である[5]。

この問題を克服するため、筆者は **FRET** バイオセンサーのアクセプターとして量子効率のきわめて低い、すなわち蛍光をほとんど発しない蛍光タンパク質 **sREACH** (super resonance energy accepting chromoprotein) をアクセプターに用い、ドナー蛍光タンパク質の蛍光量の減少を **FRET** の指標とすることで、二光子励起顕微鏡下で使用可能な **FRET** バイオセンサーを開発した[6]。

これまでも二光子励起顕微鏡を用いた **FRET** イメージングの報告はいくつか存在するが、いずれも蛍光寿命を用いた手法であり、生体内イメージングとしての汎用性を欠いている[7]。筆者が開発した **FRET** バイオセンサーは市販の二光子励起顕微鏡で観察することができ、生体内深部における細胞がん化機構の解明に強力なツールとなる。

## 1.2 がん

がんは細胞の異常増殖により特徴づけられる病態である。がんの原因の一つとして、細胞増殖シグナル伝達系を構成する分子群の異常が挙げられる。例えばヒト乳がんの約 30%を占める **HER2** 陽性乳がんでは、細胞増殖シグナル伝達

系の上流に位置する受容体チロシンキナーゼ **HER2** が細胞に過剰発現することで、細胞の増殖を亢進させる。この **HER2** 陽性乳がんの治療にはトラスツズマブという **HER2** 中和抗体が効果を示し、現在臨床で頻用されている[8]。このような細胞増殖シグナル伝達系を標的にした分子標的治療薬は、現在国内で承認されているだけでも **30** 種類以上ある。一方、近年の研究から、がん細胞集団が単一の特性を示すものではないこと（がんの不均一性）、がん細胞が周囲の正常細胞と相互作用し、増殖しやすい環境を作ること（がんの微小環境）が明らかにされてきた[9]。これらの成果は、それまでの細胞株を用いた二次元のがん研究ではなく、三次元培養やがん組織を用いた研究から明らかになったものである[10]。このような背景のもと、抗がん剤研究もがん幹細胞やがん微小環境を標的としたものに移行している[11]。アンメットメディカルニーズ（有効な治療方法が存在しない医療分野）として挙げられるがんを根治するためには、がんが起る原因、過程を個体レベルで解析し、治療対象とすることが必要である。

### 1.3 生体イメージングとがん研究

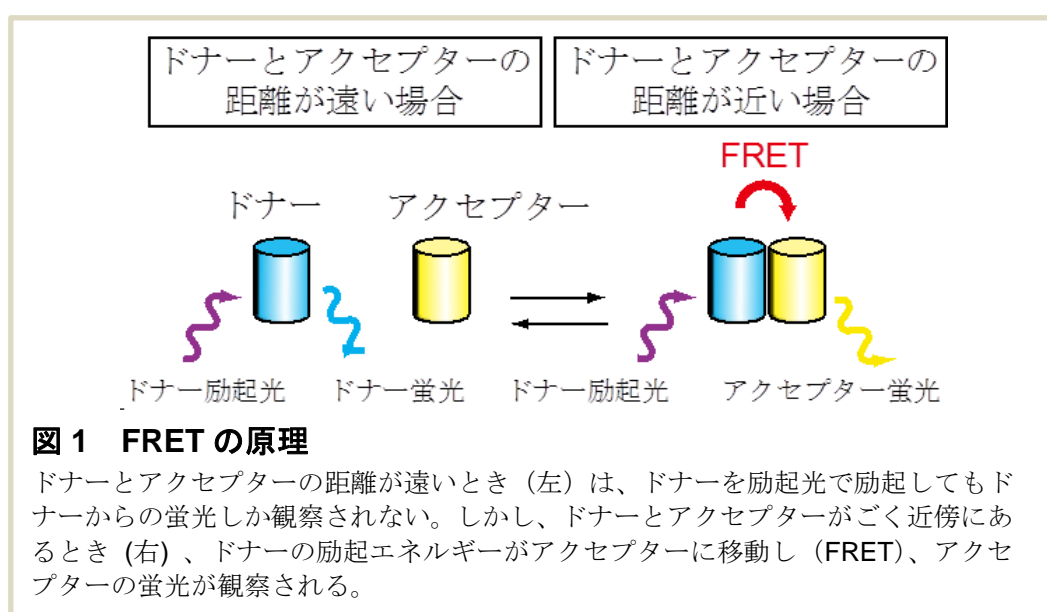
個体レベルの解析を行うために生体イメージングは有用である。生体イメージングは大きく二つに分けることができる。一つは核磁気共鳴画像法 (**MRI**, **Magnetic Resonance Imaging**) やポジトロン断層法 (**PET**, **Positron Emission Tomography**) に代表される生体をマクロで観察する手法であり、どちらも現在臨床で使用されている診断技術である[12]。もう一つは二光子励起顕微鏡を代表とする生体内をミクロで観察する手法である。二光子励起顕微鏡は、二つの近赤外の光子を同時に蛍光タンパク質に照射することにより、一光子で照射するよりも弱いエネルギーで蛍光タンパク質を励起することができる「二光子励起現象」を利用した顕微鏡である[13]。近赤外光を使用するため可視光よりも深部を観察することができ、焦点面以外の褪色が少ないという利点がある。現在、



二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングは脳神経、免疫、がんと多様な研究分野で行われている[14]。これらの研究において組織特異的に蛍光タンパク質を発現させ、特定の細胞の発生、形態変化、動態を観察するという手法が用いられている[15]。この時目的とする細胞内の分子活性を観察できれば、得られる情報はさらに有意義なものとなる。

#### 1.4 FRET バイオセンサーと二光子イメージング

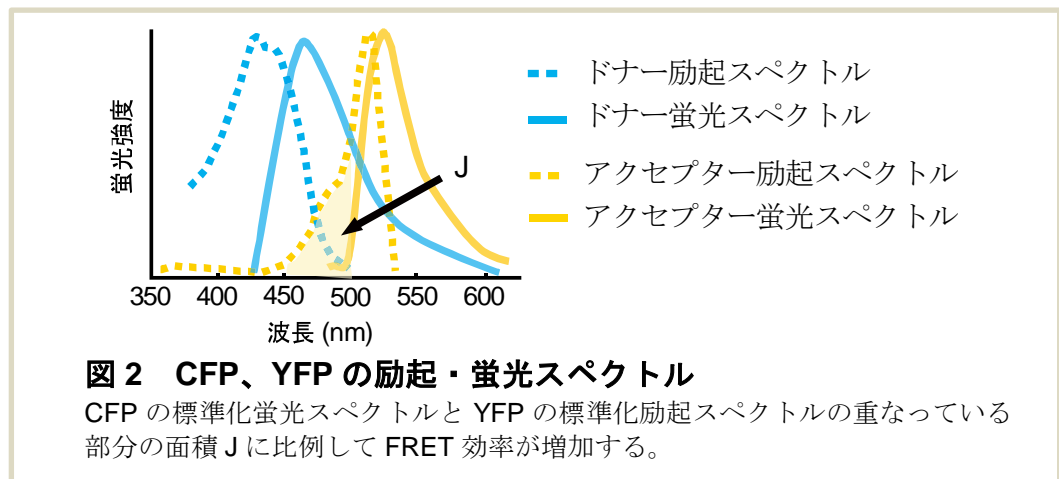
FRET バイオセンサーは、ドナーとなる蛍光タンパク質とアクセプターとなる蛍光タンパク質が近接するとき、励起されたドナーからアクセプターにエネルギーが移動する「蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)」の原理を利用したバイオセンサーである (図 1)。カルシウムを始めとし、アデノシン三リン酸、低分子量 G タンパク質、チロシンキナーゼ、カスパーゼ、イノシトールリン脂質などを標的とした多種の FRET バイオセンサーが開発され、細胞内の様々な生命現象が明らかにされている[16-18]。FRET の観察にはアクセプターとドナーの蛍光強度比を指標とする手法とドナー蛍光タンパク質の蛍光寿命を指標とする手法がある。蛍光強度比を指標とする手法は、市販されている顕微鏡を用いて



も簡便に観察可能であり、広く行われている。蛍光強度比を指標とする **FRET** 観察をする際、ドナー、アクセプターとして最も用いられている蛍光タンパク質は **CFP** と **YFP** である。一方、蛍光寿命 **FRET** の指標とする蛍光寿命測定法は確立した手法だが、蛍光寿命の算出のための装置が必要となるという問題点がある。現在報告されている二光子励起顕微鏡での **FRET** 観察のほとんどは蛍光寿命を測定したものであり、蛍光強度を指標とした **FRET** 観察は二光子励起顕微鏡で行われているが普及はしていない[19]。その理由は二光子励起を行うとアクセプター蛍光タンパク質が交叉励起され、正確な **FRET** 値を得られないという問題にある。二光子励起は吸収断面積が単光子励起に比べ広いため、交叉励起が強く起こる[20]。交叉励起とはドナー励起波長でアクセプターが励起されることを指す。**FRET** バイオセンサーにおいてアクセプターの交叉励起が起こると **FRET** 観察時のアクセプターの蛍光増加を検出できなくなるため、シグナルノイズ比が低下する。この問題を解決することが、蛍光強度を指標とする **FRET** 観察における課題である。

### 1.5 **FRET** バイオセンサーの構造

**FRET** バイオセンサーには大別して、一分子型と二分子型の二種類が存在する。一分子型 **FRET** バイオセンサーはドナーとアクセプターの他、基質ドメイン、結合ドメインなどのバイオセンサーとして必要な部品をすべて一分子に持つバイオセンサーである。一方、二分子型 **FRET** バイオセンサーはドナーとアクセプターを別分子に持ち、基質ドメインと結合ドメインはそれぞれドナーもしくはアクセプターに配置される。二分子 **FRET** バイオセンサーに比べ、一分子 **FRET** バイオセンサーはシグナルノイズ比が高いという利点がある反面、分子の構造変化を考慮する必要があるため設計が難しいという欠点がある。**FRET** バイオセンサーを設計する上で重要なことは、①ドナー、アクセプターとなる



蛍光タンパク質の選択、②基質配列の選定、③FRET が起こる際のドナーとアクセプターの位置関係の3つである。以下にそれぞれについて詳説する。

#### ① ドナー、アクセプターとなる蛍光タンパク質の選択

FRET はドナーからアクセプターに励起エネルギーが遷移し、アクセプターが蛍光を発する現象である。これが起こるためには、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルに重なり (J) があることが必要となる (図 2)。また、ドナー蛍光タンパク質はエネルギーを供与することになるため、励起エネルギーを効率よく蛍光エネルギーに変換できる必要がある。この指標を量子効率と呼び、蛍光分子を励起光で励起した際の吸収光子数と放出光子数の比率で算出される。

#### ② 基質配列の選定

基質配列は FRET バイオセンサーの特異性を規定する。作製した FRET バイオセンサーが標的とする分子に特異的であるか、そうでない場合いったい何の活性を見ているのかを知ることは重要である。

#### ③ FRET が起こる際のドナーとアクセプターの位置関係

最終的に FRET が起こるか起こらないかは、バイオセンサーのドナーとアクセプターの位置関係に依存する。その距離は 1 から 10 nm である必要がある。他、ドナーとアクセプターが近接する際の角度も FRET 効率に影響を与える。

ここで本研究に用いた FRET バイオセンサー、Pippi (Phosphatidylinositol phosphate indicator) と Picchu (Phosphorylation indicator of the Crkl chimeric unit) について紹介する。

### **イノシトールリン脂質バイオセンサー Pippi**

本研究で主に用いている Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub> は、2003 年佐藤らによって報告された PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol (3,4,5) - 3-phosphates) を検出する FRET バイオセンサー Flip を原型にし、筆者の所属する研究室で吉崎らによって作製された (図 3A) [21, 22]。

#### **バイオセンサーの構造**

Pippi バイオセンサーは、アミノ末端側から CFP、リンカー1 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 6 回繰り返し配列)、脂質結合ドメイン、リンカー2 (2 つの Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 3 回繰り返し配列間に Gly-Gly モチーフを挿入)、YFP、リンカー3 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 7 回繰り返し配列)、K-Ras の膜局在化シグナル (169-188 アミノ酸) をもつ。脂質結合ドメインとして、Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub> は TAPP1 (tandem PH-domain-containing protein-1) PH ドメインの 18-130 アミノ酸を[23]、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub> は GRP (general receptor for 3-phosphoinositides) の 261-382 アミノ酸を用いている[24]。

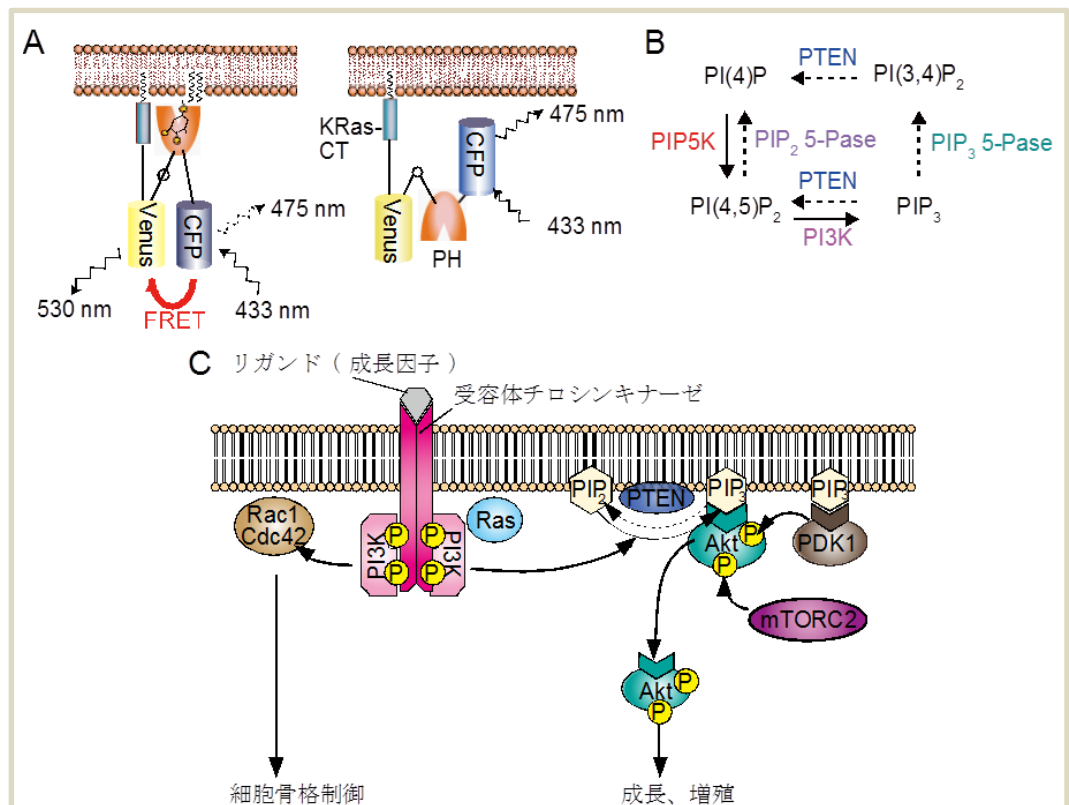
#### **バイオセンサーの作用機序**

標的であるイノシトールリン脂質群が形質膜上に存在すると、Pippi バイオセンサーはその PH ドメインで標的に結合する。このとき、バイオセンサー中の CFP と YFP が近接し、FRET が起こる。逆に、それが存在しないとき、CFP-YFP 間の距離は増大し、FRET が起こらなくなる (図 3A)。

#### **イノシトールリン脂質の機能**

イノシトールリン脂質(PI)は脂質二重膜構成成分としてのみならず、細胞内情

報伝達に重要な化合物であり、生存・増殖・アポトーシス・成長・細胞運動等の様々な過程を制御しており、癌などの病理現象の発生にも関与している。特に細胞膜の主要構成成分である  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の代謝産物の一つである  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  は、下流に生存シグナルであるキナーゼ **AKT** や細胞骨格を司る低分子 **G** タンパク質をもつ (図 3B、C)。そのため、この代謝を司るホスファチジルイノシトール 3-リン酸酵素 (**PI3K**) や脂質ホスファターゼ **PTEN** の変異は下流のシグナルの異常につながり、細胞のがん化を起こす。



**図 3 Pippi バイオセンサーとイノシトールリン脂質**

**A.** Pippi- $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  の構造。形質膜に存在する  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  がバイオセンサーの PH ドメインに結合すると、CFP と YFP は FRET が起こる位置まで近接し、433 nm の励起光を照射すると YFP 由来の 530 nm の蛍光を発する。 $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  がなくなると、バイオセンサーの構造変化が生じ、433 nm の励起光により CFP 由来の 475 nm の蛍光が観察される。**B.** イノシトールリン脂質群の代謝経路。イノシトールリン脂質は、リン酸化 (キナーゼ) あるいは脱リン酸化 (ホスファターゼ) によって様々な誘導体が出る。矢印実線の (→) はリン酸化を、破線の矢印 (----→) は脱リン酸化を示す。**C.** イノシトールリン脂質経路。P はリン酸化を示す。

## Crk チロシンリン酸化検出バイオセンサー Picchu

2001 年黒川らによって作製された CrkII アダプタータンパク質のチロシンリン酸化を検出するバイオセンサーである[16]。

### バイオセンサーの構造

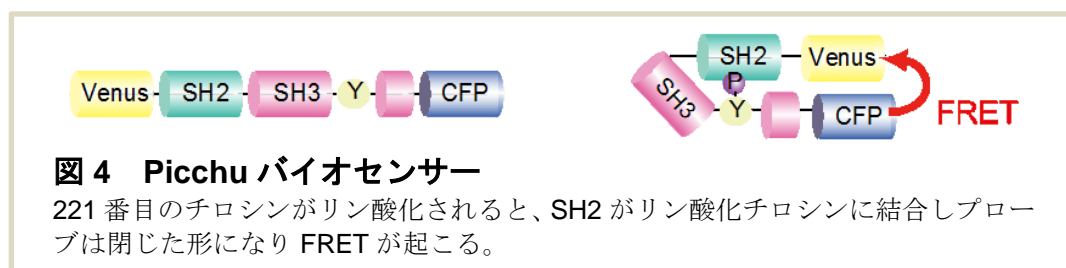
Picchu-X バイオセンサーは、アミノ末端側から YFP、リンカー (Gly-Arg) 、CrkII (1-236 アミノ酸)、リンカー (Gly-Arg)、CFP、K-Ras の膜局在シグナル (CAAX) から成る。

### バイオセンサーの作用機序

221 番目のチロシンがリン酸化されると、SH2 領域がそこに結合し、バイオセンサーは閉じた状態になる。すると、2 つの蛍光タンパク質は近接し、FRET が起こる。逆に、リン酸化されていないとき、バイオセンサーは開いた状態となり FRET は起こらない (図 4)。

### チロシンキナーゼの機能

Crk は、細胞内シグナル伝達分子であり、SH2 ドメインと SH3 ドメインのみからなるアダプター分子で、チロシンキナーゼのシグナルを下流に伝達し、細胞増殖やがんなどに関連している。Picchu バイオセンサーで認識するチロシン 221 のリン酸化については、上皮細胞増殖因子 (EGF) や神経増殖因子 (NGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、スフィンゴシン-1 リン酸で見られることから、幅広い刺激によるチロシンリン酸化を観察することが可能である[25-28]。



## 1.6 蛍光タンパク質

蛍光タンパク質の歴史は、1962 年下村博士がオワンクラゲから緑色蛍光タンパク質（GFP）を精製したことから始まった。その後、Chalfie 博士は GFP を大腸菌、線虫に発現させ、マーカーとしての有用性を示し、Tsien 博士は GFP の発光メカニズムを明らかとし、緑だけでなく多色の変異体の創出に成功した [29-31]。博士らが 2008 年にノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。現在ではオワンクラゲに加え、サンゴやウナギ由来の蛍光タンパク質も発見されている。発光団に修飾を加えることで消光の可能な蛍光タンパク質やより明るい蛍光タンパク質、近赤外の蛍光タンパク質なども開発されている。このような蛍光タンパク質の特性は 4 つに分類できる。

- ① 吸収スペクトル：蛍光タンパク質が吸収する光帯域。もっとも効率よく吸収する波長（吸収スペクトルのピーク）を最大吸収波長と呼ぶ。
- ② 蛍光スペクトル：蛍光タンパク質が蛍光を発する光帯域。もっとも強い光を発する波長（蛍光スペクトルのピーク）を最大蛍光波長と呼ぶ。
- ③ モル吸光係数：蛍光タンパク質の励起されやすさを示す指標。値が大きいほど、弱い励起光でも励起される。
- ④ 量子収率：蛍光の発しやすさを示す指標。励起された蛍光タンパク質のうち光として放射される割合を示す。値が大きいほど明るい蛍光を示す。蛍光として放射されないエネルギーの大半は熱として放射される。

一般に、蛍光タンパク質の明るさを指すときはモル吸光係数と量子収率の積を用いることが多い。以下に本研究に用いた蛍光タンパク質の特性を表に示した（表 1）。

**表 1 蛍光タンパク質の特徴**

蛍光タンパク質		最大吸収波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	モル吸光係数 (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	量子収率
オウゴン由来	EGFP	484	507	56000	0.60
	ECFP*	439	476	32500	0.40
	Venus	515	528	92200	0.57
	REACH**	510	538	100080	0.02
オウゴン由来	mTFP	462	492	64000	0.85
	mKeima	440	620	14400	0.24

最大吸収波長は吸収スペクトルのピーク、最大蛍光波長は蛍光スペクトルのピークを指す。モル吸光係数は蛍光タンパク質の励起されやすさ、量子収率は蛍光タンパク質の蛍光の発しやすさをしめす。\*) SECFP に関する情報が見つからなかったため、ECFP の情報を記載した。\*\*) sRAECh に関して、以上の情報が明記されていなかったため、Ganesan et al.,2006 に基づき、EYFP のモル吸光係数、量子収率から換算した。



## 第二章 実験方法・材料

## 2.1 FRET バイオセンサーとプラスミド

本研究で使用した FRET バイオセンサーは、前述の Pippi、Picchu を雛形として作製された。Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTS は、アミノ末端側から Keima、TFP、リンカー1 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 6 回繰り返し配列)、脂質結合ドメイン、リンカー2 (2 つの Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 3 回繰り返し配列間に Gly-Gly モチーフを挿入)、sREACH、リンカー3 (Glu-Ala-Ala-Ala-Arg の 7 回繰り返し配列)、K-Ras の膜局在化シグナル(169-188 アミノ酸)で構成される。

Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTSmut、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTSmut は、この脂質結合ドメインに点変異 R221L、R284C をそれぞれ入れ、標的脂質への結合を阻害した。

Picchu-X は、Pippi のリンカー1 からリンカー2 までの部分に、先述の通り、CrkII (1-236 アミノ酸) をもつ。これらバイオセンサーは細胞に安定発現させるため、マウス白血病ウイルス由来ベクター pCX4 に組み込まれている[32]。

pCX4 ベクターは、発現細胞を選択するための薬剤耐性遺伝子として G418 耐性遺伝子を持つ。この他に、pCAGGS-CFP-X、pCAGGS-Venus-X (X は K-Ras の膜局在化シグナル CAAX の X に由来する)、ピコルナウイルス由来の 2A 配列を用いた pCX4puro-mKeima-P2A-sREACH、pCX4puro-mKeima-P2A-Venus[33] をそれぞれ細胞に一過性発現させ用いている。

## 2.2 細胞と試薬

ヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞 (ミラノ大学 Scita 博士より供与) およびレトロウイルス産生細胞・BOSC23 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、10000 unit/ml ペニシリン/10 mg/ml ストレプトマイシン (ナカライテスク) を含んだ

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose (Sigma-Aldrich) 培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。イヌ腎臓細胞・MDCK 細胞

(RCB0211、理化学研究所バイオリソースセンターより入手) は、10%FBS、

10000 unit/ml ペニシリン/10 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムを含んだ Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO) 培地を用い、同様に培養した。細胞へのプラスミド導入には 293fectin (Invitrogen) を用いた。顕微鏡下でのタイムラプス撮影時に用いたウシ胎児血清由来アルブミン (BSA)、上皮成長因子 (EGF) は Calbiochem から購入した。遺伝子安定発現株の薬剤選択には、2 mg/ml の G418 (和光) を用いた。

### 2.3 レトロウイルスによる遺伝子安定発現株の作製

6 cm のコラーゲンコートした培養皿上で BOSC 細胞を培養し、そこに水疱性口内炎ウイルス Vesicular stomatitis virus (VSV) のエンベロープ VSV-G をコードする pMD-G (ジュネーブ大学 Trono 博士より供与) と、マウス白血病ウイルス構造蛋白質 gag-pol をコードする pGP[32]および各種発現ベクターを 293fectin (Invitrogen) で遺伝子導入した。48 時間後、ウイルスを含有する培地上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターに通し、6 cm コラーゲンコートディッシュに撒いた MDCK 細胞に感染させた。48 時間後培地交換を行い、1 日経過後に G418 を処理し、目的とする蛋白質を発現している細胞だけを選択的に培養した。

### 2.3 蛍光スペクトルの取得

FRET バイオセンサーを発現している HeLa 細胞を用いて、可視分光ユニット SA-100 を搭載した倒立型共焦点顕微鏡 FV-1000 で蛍光スペクトルを取得した。LD405 レーザーで励起し、440 nm から 650 nm まで 5 nm 毎にラムダモードで数値データを取得した。得られたデータは Excel (Microsoft) に移し、バックグラウンドを引いた後、グラフを作成した。

## 2.4 落射型蛍光顕微鏡下での観察

### 交叉励起実験

コラーゲンコートした 35 mm ガラスボトム培養皿に HeLa 細胞を撒き、バイオセンサー導入した。24 時間後、バイオセンサー発現 HeLa 細胞を 0.1%BSA 添加 DMEM/F12 (GIBCO) 条件下でイメージングした。励起フィルターは Keima 用に XF3075 (440AF21, Omega) を、YFP 用に S492/18x (Chroma) を用い、ダイクロイックミラーは 86006bs (Omega) を用いた。蛍光フィルターは CFP 用と YFP 用にそれぞれ XF3075 (480AF30, Omega) と XF1019 (535AF26, Omega) を使用した。

### 増殖因子刺激実験

コラーゲンコートした 35 mm ガラスボトム培養皿に HeLa 細胞を撒き、バイオセンサー導入した。48 時間後、バイオセンサー発現 HeLa 細胞を 37°C、0.1%BSA 添加 DMEM/F12 (GIBCO) 条件下でイメージングし、開始 10 分後に EGF (50 ng/mL) で刺激した。常に細胞に焦点を合わせるため、オートフォーカス機能と XY 電動ステージを組み合わせた多点タイムラプス観察を行った。CFP、TFP をドナー蛍光タンパク質にもつバイオセンサーを観察する際、CFP・TFP の蛍光と、内部コントロールである Keima の蛍光を測定するために、励起フィルターは XF3075 (440AF21, Omega) を、ダイクロイックミラーは 86006bs (Omega) を、蛍光フィルターは XF3075 (480AF30, Omega) (CFP、TFP 用) と XF3015 (635DF55, Omega) (Keima 用) を用いた。GFP をドナー蛍光タンパク質にもつバイオセンサーを観察する際、GFP 蛍光と内部コントロールである Keima 蛍光を測定するために、励起フィルターは S492/18x (Chroma) と XF3075 (440AF21, Omega) を、ダイクロイックミラーは 86006bs (Omega) を、蛍光フィルターは GFP 用と Keima 用にそれぞれ XF3040 (510WB40, Omega)

と XF3015 (635DF55, Omega) を使用した。照明は 75 W のキセノンランプを用い、12%の減光フィルターを通した光を細胞に照射することでドナーと Keima の蛍光画像を、またハロゲンランプによる光を照射して位相画像(phase)を得た。撮影条件はドナー蛍光と Keima の画像にはそれぞれ 300~500 ミリ秒、phase の画像には 50 ミリ秒露光し、撮影間隔は 1 分で合計 30 分間(EGF 刺激)行った。

蛍光画像の撮影は冷却CCD (charge-coupled device) カメラのCool SNAP-HQ (Roper) を備えた倒立型落射蛍光顕微鏡IX-81 (Olympus) で行い、撮影条件は画像解析ソフトMetaMorph (Universal Imaging) により制御した。

得られた画像は Meta Morph (Universal Imaging) にて解析した。細胞が存在しない部分の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いた後、Keima/CFP の蛍光強度比 (FRET 効率) を算出した。この FRET 効率を図中では Keima/XFP カラー画像として表示した。カラー画像表示の赤い部分は、Keima/XFP 比の値が大きく FRET 効率が高い、すなわち標的脂質分子が多く存在していることを表している。画像の横の数値は、FRET 効率の計算値をカラー化するにあたって定めた最小値と最大値を表し、増殖因子を用いた実験では刺激・添加前の平均 FRET 効率、運動を観察した実験では最初の 1 枚の FRET 効率の値に対してその上下 12~30%が最小値と最大値にあたる。数値解析には Excel を用いた。

## 2.5 二光子励起顕微鏡下での観察

### 交叉励起実験

コラーゲンコートした 35 mm ガラスボトム培養皿に HeLa 細胞を撒き、バイオセンサー導入した。48 時間後、バイオセンサー発現 HeLa 細胞を 37°C、0.1%BSA 添加 DMEM/F12(GIBCO)条件下でイメージングした。840 nm (CFP) と 920 nm (YFP) でそれぞれ励起し、ダイクロイックミラーは SDM570

(Olympus)、蛍光フィルターは CFP 用、YFP 用、Keima 用にそれぞれ BP460-500、BP520-560、BP570-を用いた。画像は、ピクセルサイズ 521 x 521 で、100  $\mu$ s/pixel の速さで取得した。

### 増殖因子刺激実験

コラーゲンコートした 35 mm ガラスボトム培養皿に HeLa 細胞を撒き、バイオセンサー導入した。48 時間後、バイオセンサー発現 HeLa 細胞を 37°C、0.1%BSA 添加 DMEM V (ナカライテスク) [34]の条件の下でイメージングし、開始 10 分後に EGF (50 ng/mL) で刺激した。840 nm のレーザーで励起し、ダイクロイックミラーは SDM570 (Olympus)、蛍光フィルターは CFP ドナー用、Keima 用にそれぞれ BP460-500、BP570-を用いた。画像は、ピクセルサイズ 320 x 320 で、12.5  $\mu$ s/pixel の速さで取得した。刺激による z 方向のズレの影響を減らすため、z 方向に各 4 枚画像を取得した。

蛍光画像は正立型二光子励起顕微鏡 BX61WI (Olympus) を Fluoview (Olympus) で制御して取得した。撮影した画像はバックグラウンドを差し引いたあと、Keima/XFP ratio画像を作成した (MetaMorph)。

### XY断面解析

撮影は励起光840 nm、ダイクロイックミラーSDM570 (Olympus)、蛍光フィルターBP460-500 (ドナー用)、BP570- (Keima用) を用い、ピクセルサイズ521 x 521、scan speed 100  $\mu$ s/pixelで、Kalman filterを三回かけて行った。画像は上述の通り MetaMorph上で処理し、その機能の一つであるラインスキャンで囊胞の管腔側、側面におけるKeima、TFPの蛍光強度を測定した。測定値をExcel (Microsoft) に移し、統計解析を行った。

## **2.6 MDCK 細胞を用いた三次元培養法**

球状管腔の形成においては先行論文の方法に従った[35]。簡単に述べると、培

養皿上のMDCK細胞をトリプシン処理により遊離させ、MEM に懸濁した。懸濁液の細胞数を計数し、その内7500細胞を500 mlの三次元培養用MEM [2% マトリゲル（BD）を含むMEM、組成は同上でフェノールレッド不含有] に懸濁した。24ウェルプレートウェルのウェル底に13 mmのカバーガラスを置き、その上に100%のマトリゲルを塗り広げ、37°C5%CO<sub>2</sub>条件で培養した。培地は、2日毎に交換し、6~7日間培養した。

## 2.7 統計解析

頂端膜・壁側膜のKeima/TFP値の比較を行う際、取得した数値データに対しExcel上で対応のあるt 検定と対応のない t 検定を用いて相関を調べた。

### 第三章 結果

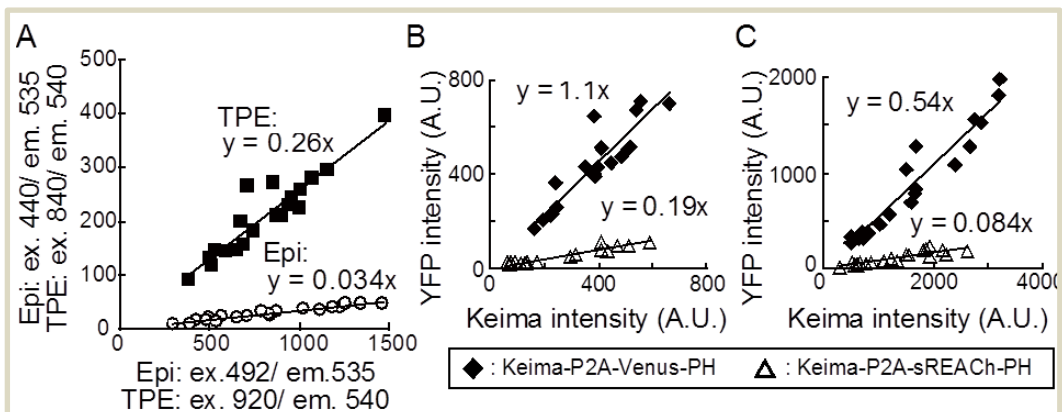


### 3.1 sREACH はほとんど蛍光を発さない

二光子励起顕微鏡観察下におけるドナー励起光によるアクセプター交叉励起を検討するため、HeLa 細胞に YFP の明るい変異体 Venus を発現させ CFP 励起光、YFP 励起光で励起した際の YFP 蛍光を落射型蛍光顕微鏡と二光子励起顕微鏡で観察した。落射型蛍光顕微鏡下では YFP 励起光で励起した際の YFP 蛍光に比べ CFP 励起光で励起した際の YFP 蛍光は 0.034 倍だった (図 5A)。二光子励起顕微鏡下ではその値は 0.26 倍であり、落射型蛍光顕微鏡を用いた際と比較すると実に約 8 倍 YFP が励起されていることが分かった (図 5A)。この結果より、二光子励起顕微鏡下で FRET 観察をする際には落射型蛍光顕微鏡を用いるよりも強い交叉励起の影響が見られることが明らかになった。

ドナーとアクセプターの蛍光比で FRET 効率を測定する場合、YFP の交叉励起はノイズの増加をもたらすため、正確な FRET 観察を行う障害となる。そこで筆者はドナー蛍光の減少のみで FRET を観察することとした。この際、交叉励起による YFP 蛍光の CFP チャンネルへの漏れこみは、CFP 蛍光量を観察する上で障害となるため、量子効率の低い YFP 変異体 sREACH を用いた。sREACH は高いモル吸光係数と低い量子効率を持つ、すなわち励起はされてもほとんど蛍光を発さない。

sREACH の交叉励起を検討するため、内部コントロールとなる Keima と sREACH もしくは Venus を 2A ペプチド配列でつないだプラスミドを構築し、HeLa 細胞に発現させ、落射型蛍光顕微鏡、二光子励起顕微鏡下で CFP 励起光による Keima、sREACH もしくは Keima、Venus の蛍光を取得した。2A ペプチド配列はリボソームのスキップ配列であり、この配列で挟んだ二つのタンパク質は個々に発現する。この配列を用いることで、二種類のタンパク質を同程度発現させることが可能である。落射型蛍光顕微鏡下において、ほぼ同程度の



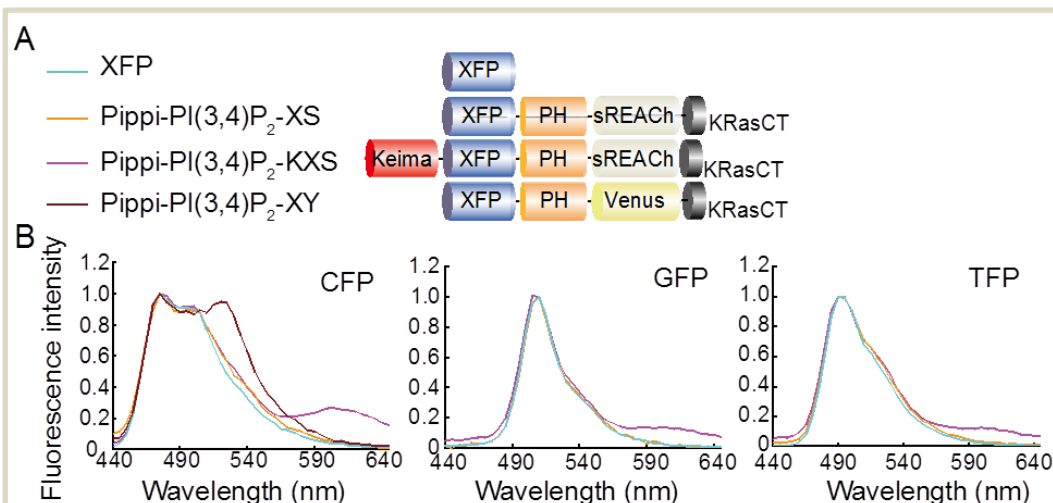
**図5 CFP 励起光による YFP の交叉励起の度合い**

**A.** 落射型蛍光顕微鏡 (○、Epi)、二光子励起顕微鏡 (■、TPE) による Venus の交叉励起の検討。X 軸に YFP 励起波長で励起した際の YFP 蛍光強度を、Y 軸に CFP 励起波長で励起した際の YFP 蛍光強度をとった。近似直線の信頼度:  $R^2 = 0.95$  (○)、 $R^2 = 0.87$  (■)。**B、C.** 落射型蛍光顕微鏡 (B)、二光子励起顕微鏡 (C) による Venus (◇)、sREACH (△) の交叉励起の検討。CFP の励起波長で励起した際の Keima の蛍光強度を X 軸に、YFP の蛍光強度を Y 軸にとっている。近似直線の信頼度: B.  $R^2 = 0.81$  (◇)、 $R^2 = 0.92$  (△)。C.  $R^2 = 0.93$  (◇)、 $R^2 = 0.80$  (△)。

Keima 蛍光に対し sREACH の蛍光は Venus に比べ 5.8 倍低かった (図 5B)。二光子励起顕微鏡下では 6.5 倍低く、sREACH は二光子励起顕微鏡下で Venus に比べ蛍光を発さないことが明らかになった (図 5C)。

### 3.2 sREACH を持つ FRET バイオセンサーの作製

これまでの結果から sREACH は YFP と比較して二光子励起顕微鏡下での蛍光が少なく、交叉励起によるノイズを軽減できると考えた。そこで、従来の FRET バイオセンサーにおける Venus を sREACH に替えた新規のバイオセンサーを設計した (図 6A)。さらに、細胞の形態変化による蛍光の増減で FRET 値が変動しないよう、バイオセンサー発現量の標準化を行う目的で赤色蛍光タンパク質 Keima を N 末端に結合した (図 6A)。標準マーカーとして Keima を用いる利点は、Keima が CFP 励起光で励起され赤色蛍光を発することにある。所有する研究室の二光子励起顕微鏡は瞬時に波長を変更することができないので、ドナー励起光と同じ波長で励起できる赤色蛍光タンパク質 Keima を用いることが必要であった。sREACH と相性のいいドナー蛍光タンパク質を探索するため、



**図6 FRET バイオセンサーの蛍光スペクトル**

**A.** PI(3,4)P<sub>2</sub>の細胞膜濃度を検出する FRET バイオセンサーPippi の構造。XFP には CFP、GFP、TFP のいずれかが該当する。**B.** 各バイオセンサーの蛍光スペクトルを FV1000 (Olympus) にて取得した。405 nm で FRET バイオセンサーを発現した細胞を励起し、5 nm 間隔で蛍光強度を測定した。上図のグラフは、バックグラウンドを差し引き 10 細胞のスペクトルを平均して得ており、最大の値を 1 として表している。

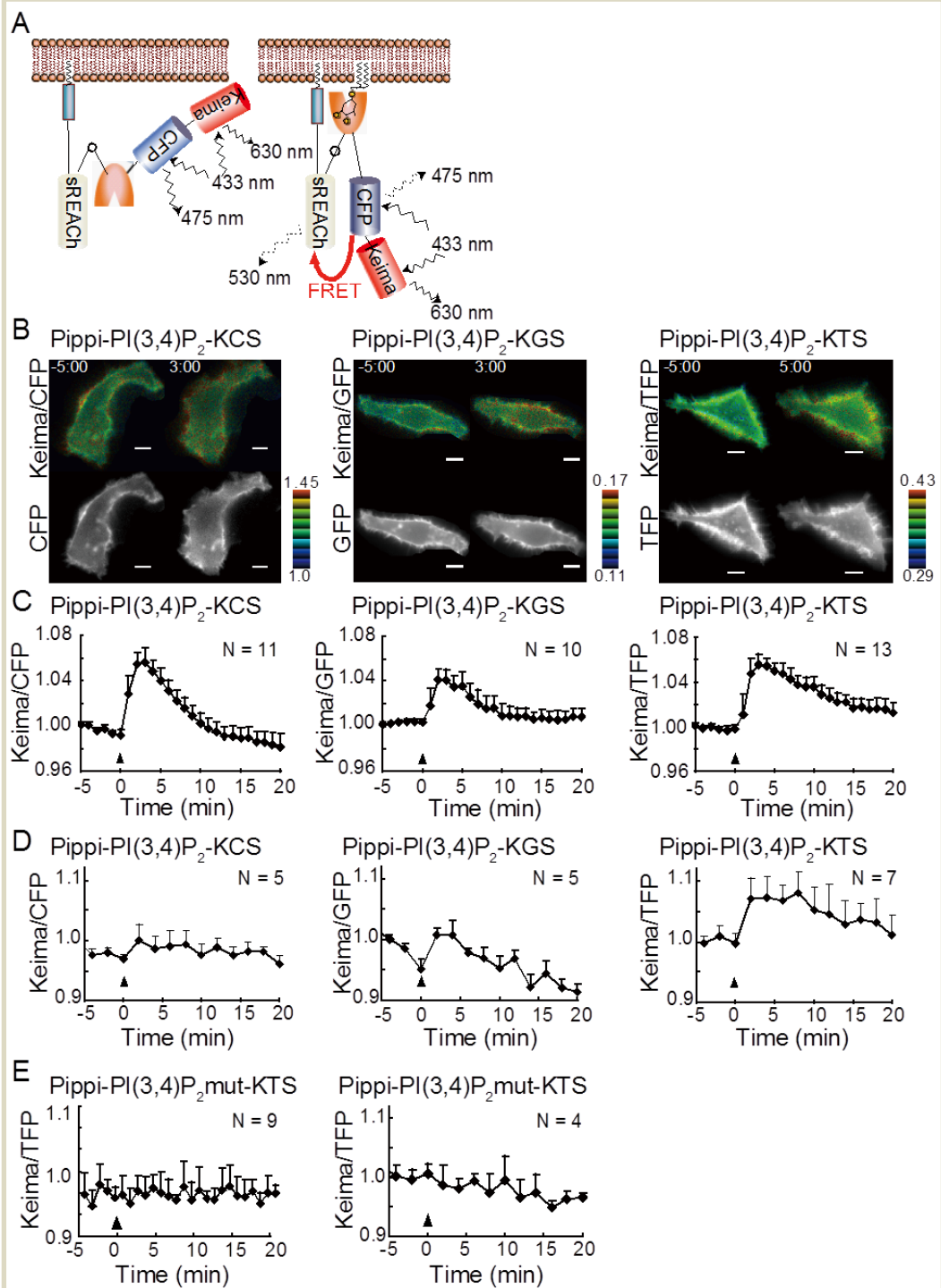
sREACH の励起波長に蛍光波長の近い三種の蛍光タンパク質 CFP、GFP、TFP をドナー（以後、XFP と記載）とし、バイオセンサーを設計した。作製したバイオセンサーを HeLa 細胞に発現させ、共焦点顕微鏡を用いて蛍光プロファイルを 5 nm 毎に取得した（図 6B）。Keima を N 末端にもたない XFP-sREACH 型のバイオセンサーは XFP のみを発現させた際の蛍光プロファイルと同一であることから、sREACH は Venus に比べ十分暗く、蛍光を無視できるということを再度確認した。Keima を N 末端にもつ Keima-XFP-sREACH 型のバイオセンサーのプロファイル結果から、Keima 蛍光はドナー蛍光に比べると 8 割暗く、標準マーカーとして用いるに十分な蛍光を取得するためには幅広い帯域を Keima 蛍光として取得する必要があること、細胞内にはすべての蛍光タンパク質が切断されずに発現していることが分かった。このことから作製したコンストラクトが確かに発現することが確認できたので、次にその機能について検討した。

### 3.3 sREACH をアクセプターにもつ FRET バイオセンサーは PI(3,4)P<sub>2</sub> に結合し FRET を起こす。

今回パイロットとして作製したバイオセンサーは PI(3,4)P<sub>2</sub> の動態変化をモニタリングする (図 7A)。PI(3,4)P<sub>2</sub> は上皮成長因子 (EGF、Epidermal Growth Factor) の刺激により増加する。従来の CFP-YFP 型バイオセンサーが EGF 刺激応答性の PI(3,4)P<sub>2</sub> 増加を検出し、一過性に FRET を起こすことは確認済みである[22]。各バイオセンサーを発現する HeLa 細胞を三時間前から無血清培地で培養して飢餓状態にし、落射型蛍光顕微鏡下で EGF 刺激による Keima/XFP 値の変化を観察した。どのバイオセンサーも凝集することなく細胞膜に均一に局在しており、Keima/XFP 画像から、EGF 添加後に細胞膜 ruffling が活発に起こっている部位で FRET が上昇していることが観察できた (図 7B)。一細胞ごとのデータの継時変化を解析した所、EGF 刺激後 Keima/XFP 値は一過性に上昇した (図 7C)。これにより、今回作製した Keima-XFP-sREACH 型バイオセンサーが PI(3,4)P<sub>2</sub> に結合し、FRET を起こすことが確認できた。またドナー間の比較によって、CFP、TFP をドナーとする FRET バイオセンサーが PI(3,4)P<sub>2</sub> の発現変化量を強く検出していることが分かった。以上から、新規に作製した Keima-XFP-sREACH 型の Pippi バイオセンサーは PI(3,4)P<sub>2</sub> の動態変化を検出すること、そのドナーとしては CFP もしくは TFP が有効であることが明らかになった。

### 3.4 二光子励起顕微鏡下での FRET 観察において、sREACH と最も相性のいいドナーは TFP である。

落射型蛍光顕微鏡下で新規に作製した Keima-XFP-sREACH 型の Pippi バイオセンサーが機能することを確認したので、次に二光子励起顕微鏡下での動作確認を行うこととした。褪色を防ぐため、20 倍の水浸レンズでズームをかけず、



**図7 EGF 刺激によるタイムラプスイメージング**

**A.** Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS バイオセンサーの動作図 **B.** 落射型蛍光顕微鏡下で観察した際の EGF 刺激前、刺激後の Keima/XFP 画像（上）、ドナー蛍光画像（下）を示した。カラーバーは暖色が Keima/TFP 値が高いことを、寒色がその値が低いことを示す。スケールバーは 20 μm を示す。 **C.** 落射型蛍光顕微鏡下で EGF 応答性の Keima/XFP 値の一過性上昇を観察した。 **D.** 二光子励起顕微鏡下で EGF 応答性の Keima/XFP 値の一過性上昇を観察した。 **E.** PI(3,4)P<sub>2</sub> 非結合型の変異体バイオセンサー Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS バイオセンサーは EGF 刺激で Keima/XFP 値を変動しない。グラフは全て、刺激前の Keima/XFP の値の平均で割った値をプロットした。

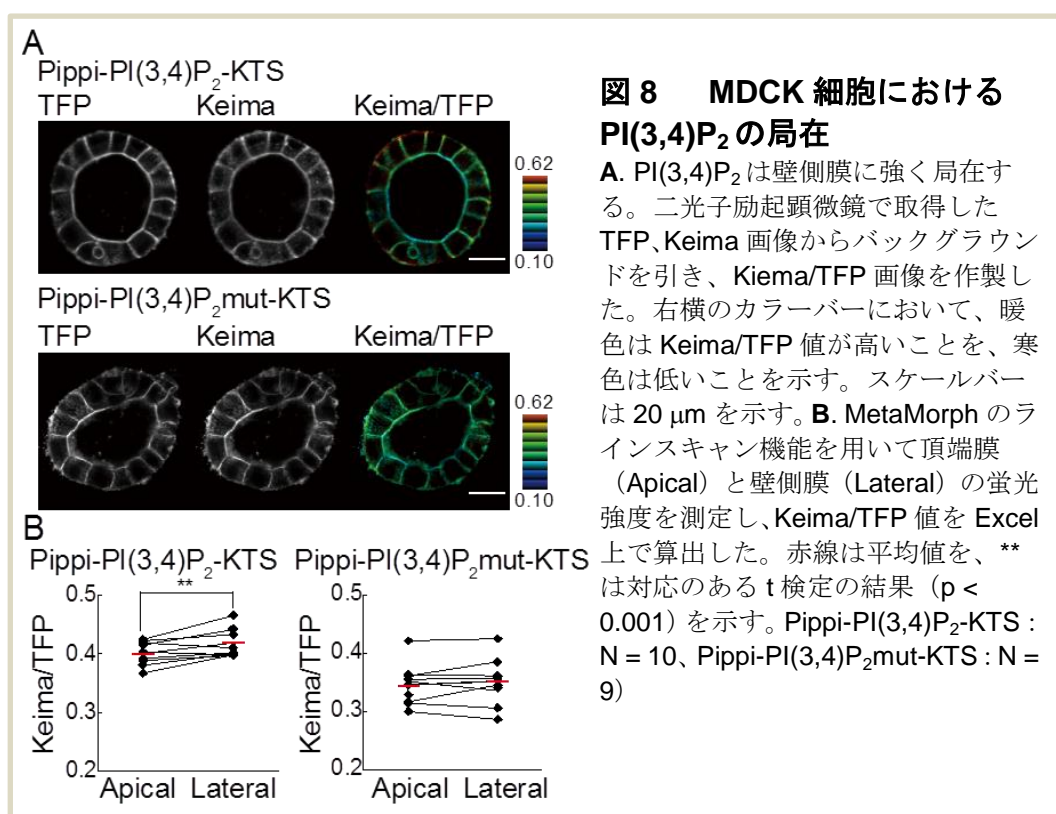
撮影スピードを速くし、2分おきにデータを取得した。また、褪色を防ぐ培地として報告されている DMEM-V を用いた。DMEM-V は培地中のビタミンを除いた培地で、これにより GFP の褪色を抑制することが可能である[34]。刺激による z 軸のズレを補正するために一回の撮像に対し z 方向に 4 スライスデータを取得し、4 枚の画像を重ねて解析した。一細胞における Keima/XFP 値の継時変化を Excel で解析した所、落射型蛍光顕微鏡下での観察結果同様に EGF 刺激後 Keima/XFP 値の一過性上昇が見られた (図 7D)。興味深いことに、落射型蛍光顕微鏡下での結果と異なり、ドナーに TFP を用いたバイオセンサーが刺激時の Keima/XFP 値の変化量 (ダイナミックレンジ) が最も大きく、CFP、GFP に関してはほとんどそれが見られなかった。この結果から、二光子励起顕微鏡下では TFP をドナーとするバイオセンサーが有効であることが分かった。

### 3.5 TAPP1 ドメイン R221H 変異によって Pippi バイオセンサーは PI(3,4)P<sub>2</sub> に結合しない。

TFP をドナーとするバイオセンサーが二光子励起顕微鏡下での観察に最も適していることが明らかになったので、以後の実験はドナーに TFP をもつ Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS を用いて行った。このバイオセンサーの TAPP1 ドメインに R221H 変異を入れ、PI(3,4)P<sub>2</sub> 非結合型変異体バイオセンサー Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>mut-KTS を作製した。これを HeLa 細胞に発現させ、EGF 刺激に対する Keima/TFP 値の変化を落射型蛍光顕微鏡、二光子励起顕微鏡下で観察した。一細胞における Keima/TFP 値の継時変化を Excel で解析した所、どちらにおいても変異体バイオセンサーは EGF 添加によって Keima/TFP の値を変動しなかった (図 7E)。以上より、変異体バイオセンサーは PI(3,4)P<sub>2</sub> の動態変化を検出せず、陰性対象として用いることが可能であることがわかった。

### 3.6 PI(3,4)P<sub>2</sub>は頂端膜ではなく壁側膜に多く局在する。

これまでに新規に作製した FRET バイオセンサー Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS が二光子励起顕微鏡下で PI(3,4)P<sub>2</sub> の動態を観察することを確認したので、次に生体内に近い三次元環境で PI(3,4)P<sub>2</sub> 動態を観察することとした。イヌ腎臓上皮細胞 (MDCK) はマトリゲル上で培養することによりシスト (嚢胞) と呼ばれる単層の細胞塊を形成する。イノシトールリン脂質やその下流のシグナル伝達分子である Rho ファミリー GTP タンパク質 (RhoA、Rac1、Cdc42) はアクチン骨格の制御によりシストの構造骨格を維持する。Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS、Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>mut-KTS を安定発現する MDCK 細胞にシストを形成させ、三次元構造における PI(3,4)P<sub>2</sub> の局在を二光子励起顕微鏡で観察した。Keima/TFP 画像とラインスキャンで頂端膜、壁側膜の Keima/TFP を算出した結果から、頂端膜に比べ壁側膜で強く FRET が起こっていることがわかった (図 8A、B)。変異体バイオセンサーにおいては、頂端膜と壁側膜で有意な差が見られなかったこ

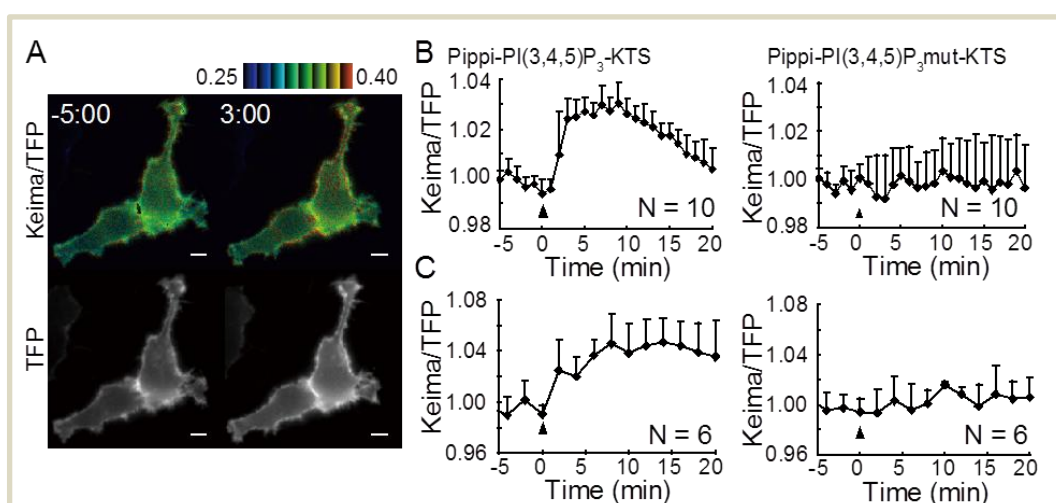




とから、頂端膜に比べ壁側膜に PI(3,4)P<sub>2</sub> が多く集積していることが明らかになった。さらに、頂端膜において Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>mut-KTS の Keima/TFP 値に比べ Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS の同値が高いことから、Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS は頂端膜における PI(3,4)P<sub>2</sub> の basal レベルを検出していると考えられる。

### 3.7 Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーは他のイノシトールリン脂質を検出する FRET バイオセンサーにも適用可能である。

ここまで、今回作製した Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS が落射型蛍光顕微鏡、二光子励起顕微鏡下で FRET 観察に用いることを示した。次に KTS 型バイオセンサーが他のリン脂質を観察する FRET バイオセンサーに適用可能であることを検討するため、バイオセンサーの TAPP1PH ドメインを PI(3,4,5)P<sub>3</sub> に結合する GRP ドメインに変更した。同時に陰性コントロールとして GRP ドメインに R284C



**図9 KTS型バイオセンサーの応用①**

**A.** 落射型蛍光顕微鏡下で観察した際の EGF 刺激前、刺激後の Keima/TFP 画像 (上)、ドナー蛍光画像 (下) を示した。カラーバーは暖色が Keima/TFP 値が高いことを、寒色がその値が低いことを示す。スケールバーは 20 μm を示す。 **B.** Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTS、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>mut-KTS を発現する HeLa 細胞を用い、落射型蛍光顕微鏡下で EGF 刺激を行った。刺激後、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTS 発現 HeLa 細胞では Keima/TFP 値が一過性に上昇した。 **C.** Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTS、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>mut-KTS を発現する HeLa 細胞を用い、二光子励起顕微鏡下で EGF 刺激を行った。刺激後、Pippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-KTS 発現 HeLa 細胞では Keima/TFP 値が一過性に上昇した。グラフは全て、刺激前の Keima/TFP の値の平均で割った値をプロットした。



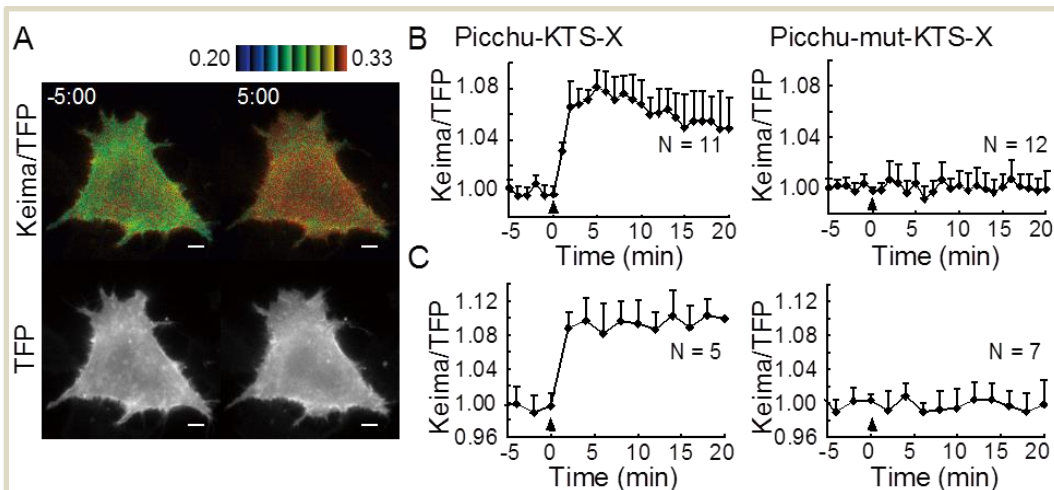
変異を入れた変異体バイオセンサーを作製した。このバイオセンサーを HeLa 細胞に発現させ、落射型蛍光顕微鏡、二光子励起顕微鏡下で EGF 刺激に対する反応を観察した。Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS を発現させた時と同様に、作製した FRET バイオセンサーは凝集することなく細胞膜に均一に局在しており、Keima/TFP 画像から EGF 添加後に細胞膜で ruffling が活発に起こっている部位で FRET が高いことが観察できた (図 9A)。一細胞における Keima/TFP 値の経時変化を Excel で解析した所、PI(3,4)P<sub>2</sub> 観察時と同様に一過性に Keima/TFP の値が上昇した (図 9B、C)。一方で変異型バイオセンサーを用いた実験では、EGF に対する同値の値上昇は起こらなかった。以上より、Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーは PI(3,4,5)P<sub>3</sub>を検出する FRET バイオセンサーにも適用可能であることが明らかになった。

### 3.8 Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーはキナーゼを検出する FRET バイオセンサーにも適用可能である。

Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーが同じ構造を持つ、他のリン脂質を検出する FRET バイオセンサーに適用可能であることは明らかになったので、今度は、構造の異なる FRET バイオセンサーに適用可能かを検証するため、チロシンキナーゼ検出 FRET バイオセンサー Picchu-KTS-X とチロシンリン酸化部位に変異を持つ Y221F 変異体バイオセンサー Picchu-mut-KTS-X を作製した。

Picchu-KTS-X を HeLa 細胞に発現させ、落射型蛍光顕微鏡、二光子励起顕微鏡下で EGF 刺激に対する反応を観察した。イノシトールリン脂質のバイオセンサーを発現させた時と同様に、作製した FRET バイオセンサーは凝集することなく細胞膜に均一に局在していた (図 10A)。一方で、イノシトールリン脂質バイオセンサーと異なり、FRET は EGF 添加後 ruffling 部位だけでなく細胞全体で起こっていた。一細胞における Keima/TFP 値の経時変化を Excel で解析した所、

EGF 刺激後すぐに Keima/TFP 値は上昇し、高い値を 20 分以上維持した (図 10B、C)。変異型バイオセンサー Picchu-mut-KTS-X を用いた実験では、EGF 刺激による同値の上昇は見られなかった。以上より、Keima-TFP-sREACH 型バイオセンサーはキナーゼを検出する FRET バイオセンサーにも適用可能であると考えられる。



**図 10 KTS 型バイオセンサーの応用②**

**A.** 落射型蛍光顕微鏡下で観察した際の EGF 刺激前、刺激後の Keima/TFP 画像 (上)、ドナー蛍光画像 (下) を示した。カラーバーは暖色が Keima/TFP 値が高いことを、寒色はその値が低いことを示す。スケールバーは 20 μm を示す。 **B.** Picchu-KTS-X、Picchu-mut-KTS-X を発現する HeLa 細胞を用い、落射型蛍光顕微鏡下で EGF 刺激を行った。刺激後、Picchu-KTS-X 発現 HeLa 細胞では Keima/TFP 値が高い状態を 20 分以上維持した。 **C.** Picchu-KTS-X、Picchu-mut-KTS-X を発現する HeLa 細胞を用い、二光子励起顕微鏡下で EGF 刺激を行った。刺激後、Picchu-KTS-X 発現 HeLa 細胞では Keima/TFP 値が高い状態を 20 分以上維持した。グラフは全て刺激前の Keima/TFP の値の平均で割った値をプロットした。

## 第四章 考察

二光子励起顕微鏡を用いた **FRET** 観察は蛍光寿命を利用した **FRET-FLIM** において既になされている[7]。しかし蛍光寿命の測定には専用の機器を必要とするため、**FRET-FLIM** は一般的ではなかった。蛍光強度比を利用した **FRET** の取得もいくつか報告があるが、ノイズが大きいことから普及はしていなかった。そこで、今回筆者はドナー蛍光の減少のみで **FRET** を観察する新規のバイオセンサーを作製した。本研究において筆者は、新規に作製した **Keima-TFP-sREACH** 型 **FRET** バイオセンサーが落射型蛍光顕微鏡下、二光子励起顕微鏡下の両方において **FRET** 観察を可能とすること、この組み合わせが構造の異なる他の **FRET** バイオセンサーにも応用可能であることを示した。

### **アクセプター蛍光タンパク質 sREACH**

従来の **CFP-YFP** 型 **FRET** バイオセンサーで頻用されるアクセプタータンパク質である **Venus** は強い蛍光を発し、**CFP** 蛍光チャンネルでもその蛍光が観察される。ドナー蛍光の減少だけで **FRET** を観察する上でアクセプター光のドナーチャンネルへの漏れこみは不利である。そこでエネルギーを吸収しても自身が光らない蛍光タンパク質をアクセプターとして用い、正確にドナー蛍光の減少を測定できるバイオセンサーを作製した。その候補とした蛍光タンパク質が **sREACH** である。**sREACH** は、モル吸光係数は高い (**EYFP** の 1.2 倍) が量子効率 is 低い (**EYFP** の 0.03 倍) [6]。エネルギーを吸収するが発光をほとんどしないので、ドナーからの遷移エネルギーは効率よく吸収するが、アクセプターとして自身が蛍光を発することはほとんどなく、理想的である。エネルギーを吸収するが蛍光としては放出しない **sREACH** は、発熱によりエネルギーを放出する。その熱が細胞状態を悪化させる可能性が考えられたが、**sREACH** を用いた過去の文献においても熱放散が細胞状態に影響を与えるとする報告はなく、本研究においても細胞状態は正常であった[6]。これらの結果を総合し、本研究

で作製したドナー蛍光量の減少を指標とする FRET バイオセンサーにおいて sREACH が有用であることが示された。

## 内部コントロール Keima

アクセプターを sREACH とすることで①を満たす FRET バイオセンサーを作製することに成功した。しかしドナー蛍光だけを観察するため、細胞形態の変化などによる蛍光強度の変化に FRET 値が影響を受けるという問題が生じた。そこでバイオセンサーの N 末端に内部コントロールとして赤色蛍光タンパク質 mKeima を融合することとした。Keima は CFP 励起光で励起され、赤色蛍光を発するストークスシフトの大きな蛍光タンパク質である[36]。Kogure らによって開発され、一量体 mKeima と二量体形成型 dKeima がある。dKeima の方が明るい、本研究においては homoFRET を防ぐ意味も含め、mKeima を用いた。mKeima を内部コントロールに用いることには一度の励起でドナーと内部コントロールの蛍光を取得できるというメリットもある一方で、デメリットも存在する。Keima 蛍光はドナー蛍光に比べかなり暗い (図 6 B)。Keima 蛍光を多く取得するために Keima フィルターを短波長カットフィルターにした。Keima の褪色による Keima/TFP 値へのノイズ混入を防ぐため、二光子励起顕微鏡下のタイムラプス撮影では撮影速度を早めることやピクセルサイズを小さくすることが必要であり、美しい画像を取得することができなかった。Keima よりも明るく褪色しにくい内部コントロールを置くことができれば、より安定した FRET 観察を行うことができると思われる。あるいは最近の二光子励起顕微鏡は、長波長と短波長を同時に照射できるレーザーを備えているので、tdTomato など赤色蛍光タンパク質を使うことも考える必要がある。

## ドナー蛍光タンパク質 TFP

本研究では sREACH をアクセプターとすることを前提に三種のドナー蛍光タンパク質を試した。候補とした CFP、GFP、TFP のどれもが YFP をアクセプターとし FRET を起こすことが知られている。筆者はどの蛍光タンパク質も sREACH のドナーとなると考えていたが、落射型蛍光顕微鏡下の観察において GFP が、二光子励起顕微鏡下の観察において CFP と GFP が FRET 観察に不適であった。先行研究において GFP-sREACH の組合せは二光子 FRET-FLIM 法のドナー、アクセプターとして用いられており、FRET 効率は GFP-Venus を用いた時と相違ない値であった[6]。その一方で、GFP は通常 YFP をアクセプターとする FRET バイオセンサーのドナーになることは少なく、筆者の所属する研究室でも YFP をアクセプターとする場合のドナーは専ら CFP もしくは TFP であり、GFP をドナーとする場合のアクセプターは RFP に代表される赤色蛍光タンパク質である。その理由は GFP と YFP の蛍光スペクトルが近いため、蛍光の漏れこみ (Bleed through) や交叉励起が強く起こるからである。ただ今回のようにドナー蛍光タンパク質の蛍光減少のみで FRET を観察する場合、上記に挙げられる点は問題にはならないと考えていた。にもかかわらず、

Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KGS バイオセンサーは最も刺激後の変化量が低かった (図 7B、C)。GFP 蛍光は CFP、TFP に比べると蛍光スペクトルが長波長側に存在するので、内部コントロールとした Keima チャネルに蛍光が漏れこんだ可能性はある。これを検討するためには GFP 単体を発現させ、漏れこみを測定する必要がある。CFP が二光子励起顕微鏡下の観察に不適であった理由は、CFP が最も暗く TFP に比べ褪色しやすいことにあると考えている[37]。二光子励起顕微鏡下のタイムラプス実験では、z のズレに対応するために一細胞に対し z 方向四枚の画像を取得した。Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KCS バイオセンサーは Keima、CFP において

褪色が生じたため適切に FRET を観察できなかった可能性がある。二光子励起顕微鏡下で用いる FRET バイオセンサーとして Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>-KTS が最も適していた。その理由は TFP が明るく光安定性が高いこと、蛍光スペクトルが Keima 蛍光波長とかぶらないことが挙げられる。他にもレトロウイルスでの発現が可能であることも TFP を用いる利点である。

### PI(3,4)P<sub>2</sub> を観察する意義

本研究ではパイロットバイオセンサーとして PI(3,4)P<sub>2</sub>を検出する Pippi-PI(3,4)P<sub>2</sub>を用いた。二光子励起顕微鏡観察にこのバイオセンサーを用いる利点は、PI(3,4)P<sub>2</sub>を含むイノシトールリン脂質が免疫染色できず、動態変化を追うことが難しい一方で、生体内において重要なシグナル伝達物質として機能することにある（序論：イノシトールリン脂質の機能）。PI(3,4,5)P<sub>3</sub>や PI(4,5)P<sub>2</sub>に比べると、PI(3,4)P<sub>2</sub>に関する研究は少ない。今までの報告から、Src 誘導性ポドソーム（接着斑）において PI(3,4)P<sub>2</sub>の強い集積がポドソーム形成因子の一つである Tks5/FISH の安定局在に必要であることが分かっている[38]。このことから PI(3,4)P<sub>2</sub>が単に PI(3,4,5)P<sub>3</sub>の代謝産物であるだけでなく、細胞骨格形成や維持において何らかの役割を果たすことが推測できる。今回 MDCK 細胞の形成する管腔構造において PI(3,4)P<sub>2</sub>の局在を観察した所、PI(3,4)P<sub>2</sub>が壁側膜に強く局在していることが明らかになった。今までの研究から、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>のホスファターゼである PTEN が頂端膜に局在し PI(4,5)P<sub>2</sub>を産生することで Par3、Par6 そして Cdc42 を頂端膜に輸送すること、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>が壁側膜に局在することが報告されており[39]、その代謝産物として PI(3,4)P<sub>2</sub>が壁側膜に局在すると考えられる。PI(3,4)P<sub>2</sub>が壁側膜に局在する意義はいまだ不明であるが、ポドソームの例に倣えば、細胞骨格因子に結合し構造を維持する機能を持つと推察される。

## Keima-TFP-sREACH 型のバイオセンサーの応用

筆者は今回作製した Keima-TFP-sREACH 型のバイオセンサーが同じ構造を持ち、他分子を検出するバイオセンサーPippi-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>に応用可能であること、異なる構造を持つバイオセンサーPicchu-Xに応用可能であることを示した。

Keima を N 末端に融合することでバイオセンサーの立体構造が変わり FRET が阻害されるのではないかと懸念していたが、これらの結果から Keima の N 末端への融合は FRET を阻害しないと判断した。研究室で所有している種々のバイオセンサーは標的タンパク質結合部位を特定の制限酵素サイトで切り抜けるように作製されており、Keima-TFP-sREACH 型のバイオセンサーも同様の構造を持っている。容易に標的タンパク質結合部位を入れ替え、多様なバイオセンサーを作製することが可能である。

## 二光子励起顕微鏡下での FRET 観察

二光子励起顕微鏡下で培養皿上に撒いた HeLa 細胞の EGF に対する挙動を観察する際には褪色が問題となったが、マトリゲル中の MDCK 細胞のシスト観察する際にはあまり褪色が起きなかった。HeLa 細胞の観察実験においては z 軸のズレを軽減するために一細胞につき z スライス を 4 枚取得したことが原因だと考えられるが、実際に二光子励起顕微鏡下で観察を行う際には MDCK 細胞のシスト観察のように厚みのある試料や生体組織を観察するため、褪色は大きな問題にはならないと考えている。今回二光子励起顕微鏡観察で発見した大きな問題点は、シストのような厚みのある試料を観察すると z 方向で Keima/TFP 値の偏りが出ることである。具体的にはレンズに近い部位の Keima/TFP 値が低く（青く）遠い部位の値が高く（赤く）なった。短波長側の TFP 蛍光が Keima の蛍光よりもより強く散乱した結果だと考えている。このため、今回作製した Keima-TFP-sREACH 型 FRET バイオセンサーでは深さの異なるサンプルの



Keima/TFP 値を用い、分子の活性や動態について議論することはできなかった。

この問題を解決するためにはそれぞれのタンパク質において深さと蛍光散乱の補正する必要があるだろう。

## 最後に

本研究において作製した新規 **FRET** バイオセンサーは、二光子励起顕微鏡下で **FRET** 観察を可能とする一つ的手段として有用であるが、ダイナミックレンジが **CFP-YFP** 型の **FRET** バイオセンサーに比べて劣ることは否めない。また、ドナー**TFP** と内部コントロール **Keima** の蛍光スペクトルに隔たりから **z** 方向の **Keima/TFP** 値に偏りが生じるため、深さの異なるサンプルにおいて活性を観察することはできないという問題点も明らかとなった。

本研究においては、「ドナー蛍光量の増減により **FRET** を観察する。」という方針の下、バイオセンサー作製に取り組んだ。しかしこの他にも、交叉励起による影響を克服できるほどダイナミックレンジの良い **FRET** バイオセンサーを開発する方法や二光子励起顕微鏡の励起帯域を狭くする方法も二光子励起顕微鏡下での **FRET** 観察を可能とすると考えている。今回の成果を全てとするのではなく、最も良い方法で二光子励起顕微鏡下での **FRET** 観察を達成することが必要である。

実際に二光子励起顕微鏡下で生体 **FRET** 観察を行う際には褪色の他にも自家蛍光や観察時のストレスの影響など多くの要因を考慮に入れなければならない。二光子励起顕微鏡による **FRET** 観察は未だ開発途上の手法であるため、その結果が生理活性を反映していることを立証する必要もある。生体組織を用いた免疫染色法やリアルタイム **PCR**、ウェスタンブロッティングなど種々の技術を併用して研究を進めるべきである。

解決すべき問題は残っているものの、生体での **FRET** 観察はこれまで明らかでなかった生体内の謎を解明する糸口となるだろう。筆者の最終的な目標はがん組織の生体 **FRET** 観察を行い、がん化過程やがん組織における細胞ヒエラル

キーを明らかにすることである。本研究におけるバイオセンサーの開発はその一歩であると期待している。

## 謝辞

本研究ならびに論文を作成するにあたり、ご指導くださった松田道行教授、実際の研究を進める中で、実験やディスカッションにおいてご指導くださった清川悦子金沢医科大学教授、二光子励起顕微鏡を用いる際、技術的な指導をしてくださった上岡裕治助教、MDCK 細胞の三次元構築をご指導くださった八木俊輔博士、ならびに多くの助言を下された研究室の先生方、先輩方、技術員の方々に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuka Kumagai, Yuji Kamioka, Shunsuke Yagi, Michiyuki Matsuda, Etsuko Kiyokawa

A genetically encoded Förster Resonance Energy Transfer biosensor for two-photon excitation microscopy

Analytical Biochemistry, 413, 192-199, 2011

## 参考文献

1. Gaggioli, C., et al., *Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1392-400.
2. Shackleton, M., et al., *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. Cell, 2009. **138**(5): p. 822-9.
3. Provenzano, P.P., K.W. Eliceiri, and P.J. Keely, *Shining new light on 3D cell motility and the metastatic process*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(11): p. 638-48.
4. Kiyokawa, E., et al., *Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Forster Resonance Energy Transfer (FRET): Implications for signaling and pharmacology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011. **51**: p. 337-58.
5. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1369-77.
6. Murakoshi, H., S.J. Lee, and R. Yasuda, *Highly sensitive and quantitative FRET-FLIM imaging in single dendritic spines using improved non-radiative YFP*. Brain Cell Biol, 2008. **36**(1-4): p. 31-42.
7. Yasuda, R., *Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy*. Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(5): p. 551-61.
8. Ross JS, F.J., *The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy*. Stem Cells., 1998. **16**(6): p. 413-28.

9. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 314-22.
10. Pece, S., et al., *Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content*. Cell, 2010. **140**(1): p. 62-73.
11. Nakanishi, Y., et al., *Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine*. Nat Genet, 2013. **45**(1): p. 98-103.
12. Sudol-Szopinska, I. and J.B. Cwikla, *Current imaging techniques in rheumatology: MRI, scintigraphy and PET*. Pol J Radiol, 2013. **78**(3): p. 48-56.
13. Diaspro, A., G. Chirico, and M. Collini, *Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy*. Q Rev Biophys, 2005. **38**(2): p. 97-166.
14. Okada, T., et al., *Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e150.
15. Wierenga, C.J., N. Becker, and T. Bonhoeffer, *GABAergic synapses are formed without the involvement of dendritic protrusions*. Nat Neurosci, 2008. **11**(9): p. 1044-52.
16. Kurokawa, K., et al., *A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31305-10.
17. Miyawaki, A., et al., *Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 882-7.
18. Mochizuki, N., et al., *Spatio-temporal images of*

- growth-factor-induced activation of Ras and Rap1*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1065-8.
19. Majoul, I., et al., *Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein-protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy*. J Biotechnol, 2002. **82**(3): p. 267-77.
  20. Kawano, H., et al., *Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins*. Nat Meth, 2008. **5**(5): p. 373-374.
  21. Sato, M., et al., *Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(11): p. 1016-22.
  22. Yoshizaki, H., et al., *Akt-PDK1 complex mediates epidermal growth factor-induced membrane protrusion through Ral activation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 119-28.
  23. Dowler, S., et al., *Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 19-31.
  24. Klarlund, J.K., et al., *Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1927-30.
  25. Hashimoto, Y., et al., *Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17186-91.
  26. Blakesley, V.A., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of Crk*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16211-5.

27. Ribon, V. and A.R. Saltiel, *Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of endogenous Crk-II and augments its association with p130Cas in PC-12 cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7375-80.
28. Beitner-Johnson, D. and D. LeRoith, *Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5187-90.
29. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
30. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
31. Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12501-4.
32. Akagi, T., K. Sasai, and H. Hanafusa, *Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13567-72.
33. Szymczak, A.L., et al., *Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 589-94.
34. Bogdanov, A.M., et al., *Cell culture medium affects GFP photostability: a solution*. Nat Methods, 2009. **6**(12): p. 859-60.
35. O'Brien, L.E., et al., *Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly*. Nat Cell Biol, 2001.



- 3(9): p. 831-8.
36. Kogure, T., et al., *A fluorescent variant of a protein from the stony coral Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(5): p. 577-81.
37. Ai, H.W., et al., *Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging*. Biochem J, 2006. **400**(3): p. 531-40.
38. Oikawa, T., T. Itoh, and T. Takenawa, *Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 157-69.
39. Martin-Belmonte, F., et al., *PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42*. Cell, 2007. **128**(2): p. 383-97.



## 第二部

「生体 FRET イメージングを用いたマウス乳がんにおける  
不均一な ERK 活性の可視化」



## 要旨

HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) はヒト乳がんの約 30%で過剰発現し、Ras-Raf-MEK-ERK 経路を活性化する。ERK の活性と乳がんの予後の相関については諸説存在し、乳がんの進行における ERK の役割は明らかではない。この問題に取り組むため、筆者は ERK 活性を測定する FRET バイオセンサー、EKAREV を発現する乳がんモデルマウスを作製した。マウスに発生した原発性乳がんを二光子励起顕微鏡下で生体観察した所、興味深いことに原発性乳がんにおいて ERK の活性分布は不均一であった。個々の細胞の ERK 活性が少なくとも数時間安定していることから、ERK 活性を安定に保持制御する機構が存在していることが推察できる。フローサイトメトリーを用い ERK の活性の高い細胞と低い細胞を分取した所、ERK の活性の高い細胞群は低い細胞群に比べ、tumorsphere を形成する能力が低く、50 細胞の同所移植においても乳がん形成能が低かった。さらに、ERK 活性の高い細胞は低い細胞に比べ、乳がん幹細胞マーカーである CD49f、CD24、CD61 の発現も低下していた。これらの結果は、高い ERK 活性は乳がん幹細胞の自己複製を抑制する可能性があること、ERK が活性化された乳がん組織はがん幹細胞の含有率が低い可能性があることを示唆している。

## 第一章 序論

## 1.1 はじめに

がん細胞は表現的、機能的に不均一性を示す。がん幹細胞の概念は単一のがんにおけるこのような不均一性の代表例である[1]。がん幹細胞は自己再生能をもち、多様ながん細胞に分化するため、抗がん剤標的として魅力的である[2]。にもかかわらず、がん幹細胞の同定は細胞表面マーカーによってなされており、生体におけるがん幹細胞を研究する手法は限られている。

HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) はヒト乳がんの約 30%で過剰発現し、予後の悪化と相関を持つ[3]。HER2/Neu (Neu は HER2 のマウスホモログである) によりがん幹細胞の特性が制御されることを示唆する報告もある。HER2 を過剰発現するヒトがん細胞株を用いた研究では、個々の細胞において HER2 発現量に比例してがん幹細胞特性が増加する[3]。正常乳腺上皮細胞に HER2 を過剰発現させると幹細胞、前駆細胞の割合が増加する[4]。これら一連の研究において、乳がん幹細胞における HER2 の過剰発現効果は HER2 阻害剤であるトラスツズマブによって妨げられる[3, 4]。さらに乳がんの進行と関連するポリコームタンパク質 EZH2 の過剰発現は RAF1 を増幅、ERK を活性化し、がん幹細胞の増加を促す[5]。

HER2/Neu 等の受容体型チロシンキナーゼは Ras-Raf-MEK-ERK 経路を介し、細胞増殖シグナルを伝達する[6]。MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) -Neu マウスは HER2/Neu 陽性乳腺上皮がんのモデルマウスとして広く用いられている[7, 8]。このマウスにおいては、ERK はサイクリン D1 の活性化によってがん幹細胞や前駆細胞の自己再生を制御し[9]、Notch の活性化によってがんの悪化を助長する[10]。これらの観察結果に一致して、がん組織中の ERK 活性が高いことは患者の予後の悪化につながることを示されている[11]。また、ERK の活性化がパクリタキセル抵抗性をもたらすという報告もされている[12]。

しかし驚くべきことに、これらの結果とは逆に **ERK** の活性が高いことが良好な予後と相関するという報告もある[13-15]。この一見矛盾する観察は、**ERK** が幹細胞の自己再生を阻害するという効果による可能性がある[16]。多くの抗がん剤が **HER2/Neu-Ras-ERK** 経路を標的にしていることを考慮すると **ERK** 活性が乳がんのがん幹細胞を正に制御するのか、負に制御するのかを知ることはきわめて重要である。この問題に取り組むため、筆者は **MMTV-Neu** マウスに発生した原発性乳がんの **ERK** 活性を観察した。観察には **ERK** を観察する **FRET** バイオセンサーを発現する遺伝子改変マウスと交配した **MMTV-Neu** マウスを用いた。二光子励起顕微鏡下でマウスを観察した所、原発性乳がんの個々の細胞の **ERK** 活性は非常に不均一であることが明らかになった。さらに筆者は **ERK** の活性に基づき乳がん細胞を分取し、**ERK** 活性の高い細胞は、低い細胞に比べ **tumorsphere** を形成する能力および乳がん形成能が劣ることを見出した。

## 1.2 がん幹細胞

近年、がん幹細胞という概念が提唱されている[1]。がん組織内に少数存在しているがん幹細胞は自己再生能をもち、多様ながん細胞に分化する能力を持つがん細胞である。このように、がん細胞集団に正常組織のようなヒエラルキーが存在するという概念は、固形がんに見られるがんの不均一性を説明するのに適している。がん幹細胞は化学療法に対する抵抗性をもち、がん再発の原因になる。化学療法を受けた乳がん患者ではがん幹細胞マーカー陽性細胞は～74%を占め、治療を受けなかった人の9%に比べ大きく増加している[17]。実験系では、マウス大腸がん幹細胞はアルキル化剤シクロホスファミドに対し抵抗性を示すことも知られている[18]。がん幹細胞の根絶ががんの再発予防になるとして、近年がん幹細胞を同定するための研究が多くなされている。がん幹細胞研究において最も確立している手法が表面抗原マーカーによる細胞分取法であり、ヒ



ト乳がんにおいては CD24、CD44 などの幹細胞マーカーが提唱されている[19]。近年の遺伝子改変技術の進歩に伴い、特異的プロモーター下で蛍光タンパクを発現させ、がん幹細胞を同定する手法も確立されている[20]。

### 1.3 乳がん

日本人女性の最も罹りやすいがんが乳がんである。診断技術や治療法の進歩から乳がん死亡率はがんの中では第 5 位となっているが、未だに年間 1 万人以上の女性が乳がん で死亡している[21]。乳がんの予防、診断、治療は表 1 に示す分類に基づいて行われる。このうち HER2 陽性乳がんは HER2 を過剰発現し、再発・転移が見られることから予後不良とされてきた。近年の抗体医薬品技術の向上により、ヒト化抗 HER2 抗体トラスツマブが登場し、予後の改善が期待できるようになった[22]。しかし乳がん手術が女性にもたらす精神的苦痛は大きく、さらなる予防的治療の向上が求められる。

分類	代表的な発現遺伝子	特徴	割合
Luminal	ERa		
luminal A	ERa高、GATA3	予後最良	28～31%
luminal B	ERa	luminal-Aより予後不良	19～23%
HER2 enriched	HER2/neu	予後不良	12～21%
Basal-like	CK5、CK17	予後不良	11～23%
Claudin low	免疫応答遺伝子、間質遺伝子	上皮間葉移行	7～14%
Normal-like	脂肪細胞や非上皮細胞に発現している遺伝子が強発現	basal-likeより予後良	3～10%

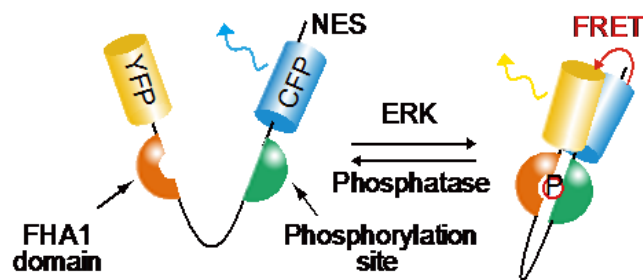
**表 1 ヒト乳がんの分類**

[戸井 雅和, 2012]

ER : estrogen receptor、CK : cytokeratin

### 1.4 FRET バイオセンサーと二光子 FRET イメージング

FRET バイオセンサーは、ドナーとなる蛍光タンパク質とアクセプターとなる蛍光タンパク質が近接するとき、励起されたドナーからアクセプターにエネルギーが移動する「蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)」の原理を利用したバイオセンサーである[23] (図 1)。カルシウムを始めとし、アデノシン三リン酸、



**図 1 FRET バイオセンサーEKAREV**

FRET バイオセンサーの基質ドメインが ERK によってリン酸化されると、FRET バイオセンサーが閉じた構造になり FRET が起こる。脱リン酸化状態になると、バイオセンサーは開いた構造になり、FRET が起こらなくなる。

低分子量 G タンパク質、チロシンキナーゼ、カスパーゼ、イノシトールリン脂質などを標的とした多種の FRET バイオセンサーが開発され、細胞内の様々な生命現象が明らかにされている[24, 25]。

二光子励起顕微鏡は、二つの光子を同時に蛍光タンパク質に照射することにより励起する「二光子励起現象」を利用した顕微鏡である。二光子励起に必要な光密度は対物レンズの焦点付近でしか達成できないので、背景光がほぼなくなり、焦点面以外の褪色も軽減できる。さらに、近赤外光を使用するため可視光よりも深部を観察することができるという利点もある[26]。現在、二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングは脳神経、免疫、がんと多様な研究分野で行われている[27]。

FRET バイオセンサーとこの二つの手法を組み合わせることで、「生体における分子活性を観察すること」が可能となる。第一部に記載のごとく、筆者はドナー蛍光の減少を観察することで二光子励起顕微鏡下での観察を可能とする FRET バイオセンサーを作製した[28]。これは従来の二光子励起顕微鏡下ではアクセプター蛍光タンパク質がドナー蛍光タンパク質の励起波長で同時に励起してしまい、FRET 値のノイズが増してしまうという問題があったためである。しかし、作製した FRET バイオセンサーは二光子励起顕微鏡下で機能はするものの、刺激を加えた際の変化量（ダイナミックレンジ）が従来の CFP-Venus 型

の FRET バイオセンサーに比べ低いという難点があった。

近年、筆者の所属する研究室では FRET バイオセンサーのダイナミックレンジを改善することに成功した[29]。さらに新しい二光子レーザー（Charp 自動補正装置が付いた Mai-Tai DeepSee）が導入され、旧来の二光子励起顕微鏡の欠点であった「アクセプターが直接に励起される」という問題が格段に軽減された。これにより、従来の CFP をドナー、YFP をアクセプターにもつ FRET バイオセンサーでの FRET 観察が可能になった[30]。

### 1.5 FRET バイオセンサー発現遺伝子改変マウス（FRET マウス）

上述の技術向上を受け、筆者の所属する研究室では近年 FRET バイオセンサーを発現するマウス（FRET マウス）を作出することに成功した[30]（図 2）。現在 PKA、ERK、Rac1、JNK を観察する FRET マウスを所持している[31]。すべてのマウスは CAG プロモーター下でバイオセンサーを発現し、皮膚や筋肉、血球など幅広い組織でバイオセンサーを発現する。このマウスを観察することで、上岡らは炎症部位において MEK 阻害剤添加で ERK 活性が低下し、好中球の遊走が停止することから好中球の遊走に ERK が必要であるということ[30]を、後藤らはマウスの腸神経形成において PKA と Rac1 が拮抗的な作用を示していることを明らかにした[31]。本研究において筆者は ERK バイオセンサー EKAREV を発現する FRET マウス（Eisuke マウス）と HER2 陽性乳がんモデルマウス MMTV-Neu を交配し、HER2 陽性乳がんにおける ERK の果たす役割を明らかにした。



**図2 FRET マウス**

FRET マウスは全身にバイオセンサーを発現しており、青色ランプ下で黄色蛍光を発する。

## 1.6 MMTV-Neu マウス

MMTV-Neu マウスは Mouse Mammary Tumor Virus プロモーター下で HER2/Neu (rat) を過剰発現する遺伝子改変マウスであり、生後四か月以降から乳腺上皮がん（以後、乳がんと略記する）を発生する[7]。乳がん発生後八か月を越えたマウスでは 72% の確率で肺転移も見られる。メスでのみ乳がん形成が見られ、ホモ接合型マウス同士の交配が可能である。本研究で交配に用いた MMTV-Neu マウスは MMTV-Neu 遺伝子をホモ接合型でもち、FVB をバックグラウンドにもつ。MMTV/activated Neu マウスに比べると乳がんの発現頻度や年齢が遅く、表現型がヒト乳がんに近いいため HER2 陽性乳がんのモデルマウスとして用いられている[32, 33]。

MMTV-Neu マウスにおいて HER2/Neu の発現は正常乳腺細胞では低く、乳がん細胞で高くなる[7]。Neu の発現に伴って細胞表面抗原の発現パターンも変化する。例えば、CD24 は正常乳腺細胞ではほとんど発現しないが、乳がん細胞では顕著に発現が上昇する。CD24 陽性乳がん細胞は MMTV-Neu マウスにおけるがん幹細胞と同定されているが、実に 8 割近いマウスが CD24 陽性のがんを発生する[34]。近年 CD24<sup>+</sup>、CD49f<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>、CD24<sup>+</sup>Jagged-1<sup>+</sup>などの分画がこのマウスにおけるがん幹細胞マーカーとして提唱されている[34-36]。Jeselson らは Her2/Neu 発現 CyclinD1 不活型である MMTV-Neu/CyclinD1<sup>KE/KE</sup> マウスにおいてがん幹細胞分画が減少することを示し、がん幹細胞の自己複製に CyclinD1

が必要であることを示した[9]。ERK は CyclinD1 の発現レベルを調節することから[37]、ERK ががん幹細胞の制御に関与していると考えられる。

## 第二章 材料と方法

## 2.1 マウス

ERK 活性観察用 FRET バイオセンサー EKAREV を発現する遺伝子改変マウス (Eisuke マウス) についてはすでに報告済みである[30]。本研究に用いた Eisuke マウスは MMTV-Neu<sup>+/+</sup> と交配する前に二世代 FVB/N マウスと戻し交配している。バイオセンサーを発現するマウスを選別するため、青色フラッシュライト：LEDGFP-3W (Optcode) で仔マウスを照明し、黄色メガネを装着し緑色蛍光を鑑別した(図 2)。動物実験は京都大学医学研究科動物実験委員会によって審議、承認されている(第 10584 番)。

## 2.2 顕微鏡と画像解析

### 二光子励起顕微鏡下での観察

Mai tai DeepSee HP Ti. Sapphire レーザー (Spectra Physics)、30 倍のシリコンレンズ (UPLSAPO 30xS; オリンパス) を搭載した顕微鏡 (IX81/FV1000) を用いた。CFP の励起波長は 840 nm で行い、赤外線カットフィルター (BA685RIF-3)、2 種のダイクロイックミラー (DM505 と DM570)、3 種の蛍光フィルター {セカンドハーモニック用：FF01-425/30 (Semrock)、CFP 用：BA460-500 (オリンパス)、YFP 用：BA520-560 (オリンパス)} を用いた。取得した画像は画像解析ソフトウェア MetaMorph (Universal Imaging) と高精細 3D-4D 画像解析ソフトウェア Imaris (Bitplane AG) で今までの報告と同様に解析した。

### 落射型蛍光顕微鏡下での観察

冷却 CCD (charge-coupled device) カメラの Cool SNAP-HQ (Roper) を備えた倒立型落射蛍光顕微鏡 IX-81 (Olympus) を用い、撮影条件は画像解析ソフト MetaMorph (Universal Imaging) により制御した。励起フィルター XF3075 (440AF21, Omega) を、ダイクロイックミラー 86006bs (Omega) を、CFP

用蛍光フィルターXF3075 (480AF30, Omega)、YFP 用蛍光フィルターS492/18x (Chroma) を用いて FRET バイオセンサーを励起し、蛍光を取得した。取得した画像は画像解析ソフトウェア MetaMorph で解析し、数値解析には Excel (Microsoft) を用いた。

#### 共焦点顕微鏡下での観察

5%CO<sub>2</sub>、37°Cインキュベータを備える可視分光ユニット SA-100 を搭載した倒立型共焦点顕微鏡 FV-1000 (Olympus) で観察を行った。CFP、YFP、7AAD の励起は 440 nm で行い、それぞれ 450-500、510-560、655-755 nm の波長を蛍光として取得した。

#### ボックス型共焦点顕微鏡下での観察

5%CO<sub>2</sub>、37°Cインキュベータを備えるボックス型共焦点顕微鏡 Fv-10i (Olympus) を行った。励起波長 405 nm を用い、CFP と YFP の蛍光は 435-485、465-565 nm の波長を蛍光として取得した。 -

### 2.3 乳腺、乳がんの生体観察

マウスは流速 0.5 L/分、1.5%イソフルラン (Abbott) で麻酔した。マウス乳腺を露出する外科的手法は過去に報告されているとおりである[38]。露出した乳腺もしくは乳がんは 37°C保温ステージに装着したカバーガラス上に固定し、倒立型二光子励起顕微鏡下で観察した。薬剤投与実験においては、 $6.0 \times 10^{-8}$  M Qtracker 655 (Invitrogen) を含む PBS に 5 mg/kg PD0325901 (Calbiochem) もしくは 50 mg/kg Lapatinib (Synkinase) を懸濁し、眼底注射した。

### 2.4 乳がん細胞の一細胞単離

EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスから得た乳がんは確立された手法にのっとり、一細胞に単離した[34, 39]。簡単には、乳がん組織をはさみで細かく切断し、



DMEM/F12 で洗浄後、消化溶液 {5% FBS、10000 unit/ml ペニシリン/10 mg/ml ストレプトマイシン (ナカライテスク)、コラゲナーゼ/トリプシン溶液を含有する DMEM/F12 (Life technologies)} に懸濁し 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞懸濁液を 400 g で遠心し上清を除いた後、10 mL の DMEM/F12 で再懸濁し 70  $\mu$ m、40  $\mu$ m のセルストレーナー (BD Falcon) に通し 400 g で遠心、上清を除いた。0.2% NaCl 溶液 4 mL で細胞を懸濁した後 1.4% NaCl 溶液を 4 mL 加え溶血させた。10 mL DMEM/F12 をさらに加え、400 g で遠心し上清を除いた。2% FBS、10 mM HEPES を含有する HBSS 培地 (Life Technologies) に細胞を懸濁し、Mouse Epithelial Cell Enrichment Kit (StemCell Technologies) を使用し、免疫磁気細胞分離法により乳腺上皮細胞を分離した。いくつかの実験では分離した細胞をコラーゲンコートもしくはマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュに撒き、2 日後に落射型蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡で観察した。

## 2.5 FRET 値に基づく細胞分取

一細胞懸濁液を L-15 培地 (Life Technologies) に再懸濁し、FACS Aria (Becton Dickinson) で解析もしくは細胞分取した。FACS Aria で FRET を観察する際に特別に用いた仕様は次の通りである。FRET を観察する際には 407 nm レーザーで励起し、CFP、YFP 蛍光取得には 480AF30 filter (Omega)、535AF26 filter (Omega) を用いた。YFP 光を観察する際には 475 nm レーザーで励起し、535AF26 filter (Omega) で蛍光を取得した。塊を除くために細胞を大きさ、粒度でゲートし、生細胞を取得するため 7AAD (BD Pharmingen) で死細胞の核を染色した。細胞分取時は FRET/CFP 値で展開したヒストグラムの上下 10% を  $ERK^{high}$ 、 $ERK^{low}$  として L-15 培地に分取した。精度を確認するために分取した

細胞を用いて再度解析を行った。

## 2.6 細胞表面抗原を用いた解析

細胞表面抗原の発現パターンをフローサイトメトリーで解析するため、Alexa-647 もしくは PE-Cy7 標識抗 CD49f 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD24 抗体、Alexa-647 標識抗 CD61 抗体を用いて細胞を染色した。細胞を 2% FBS、10 mM HEPES を含有する HBSS 培地（Life Technologies）に懸濁し、各抗体を加え氷上 30 分インキュベートした。細胞を PBS で二回洗浄したのち、L-15 培地に懸濁し 200 倍希釈の 7AAD を加えた後、FACSAria で解析した。

## 2.7 in vitro tumorsphere 形成実験

20 ng/ml epidermal growth factor（Sigma）、20 ng/ml basic fibroblast growth factor（Sigma）、5 mg/ml インスリン（Sigma）、2% B27 サプリメント（Life Technologies）を含有する乳腺上皮細胞基本培地（タカラバイオ）に細胞を  $10^4$  細胞／ウェルになるよう懸濁し、ポリ HEMA でコートした 6 ウェルプレート（Becton Dickinson）に 1 mL ずつ撒いた。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件で二週間培養し、tumorsphere の数を測定した。表計算ソフト Prism5（GraphPad）でグラフを作成した。

## 2.8 in vivo 移植実験

氷上で 20  $\mu$ l の DMEM/F12 培地と 20  $\mu$ l のマトリゲル（Becton Dickinson）を 1 : 1 で混ぜ、細胞を懸濁した。細胞懸濁液をイソフルランで麻酔した同系マウスの第 4 乳腺に注射した。乳がん形成は注射後 3 か月の時点で判断した。

## 2.9 組織免疫染色、ウェスタンブロット

切り出した乳がんを中性ホルマリンで固定、パラフィンで包埋した。パラフィン切片を脱パラフィンし、ブロッッキングした後、抗リン酸化ERK抗体(1:200、#4370S、Cell Signaling) で 4°Covernight 免疫染色し DAB 発色した。

細胞溶解液を電気泳動し、タンパクを PDVF 膜に転写した。オデッセイバッファーで 30 分間ブロッッキングした後、抗リン酸化 ERK 抗体 (1 : 2000) と抗 Tubulin 抗体 (1 : 2000、Calbiochem) で 4°Covernight 反応させた。wash 後二次抗体を常温一時間当て、Odyssey (LI-COR) で蛍光を測定した。取得した画像は Metamorph でバックグラウンドを引いた後、バンドの輝度値を定量した。数値解析は Excel で行った。

## 2.10 クラスタ解析

二光子励起顕微鏡で撮影した CFP、FRET 画像から FRET/CFP 画像を作成し、数値解析を行った。核の位置で細胞の位置を認識し、watershed アルゴリズムを用い細胞境界を設定し各細胞の FRET/CFP 値を取得した。ERK の不均一性を評価するために重み付け相関係数を改変し、以下の数式のようにクラスタ係数を定義した[40]。

$$C = \sum_{i>j} \frac{1/r_{ij}}{\sum_{m>n} 1/r_{mn}} \frac{(X_i - \langle X \rangle)(X_j - \langle X \rangle)}{\frac{1}{N-1} \sum_i (X_i - \langle X \rangle)^2}$$

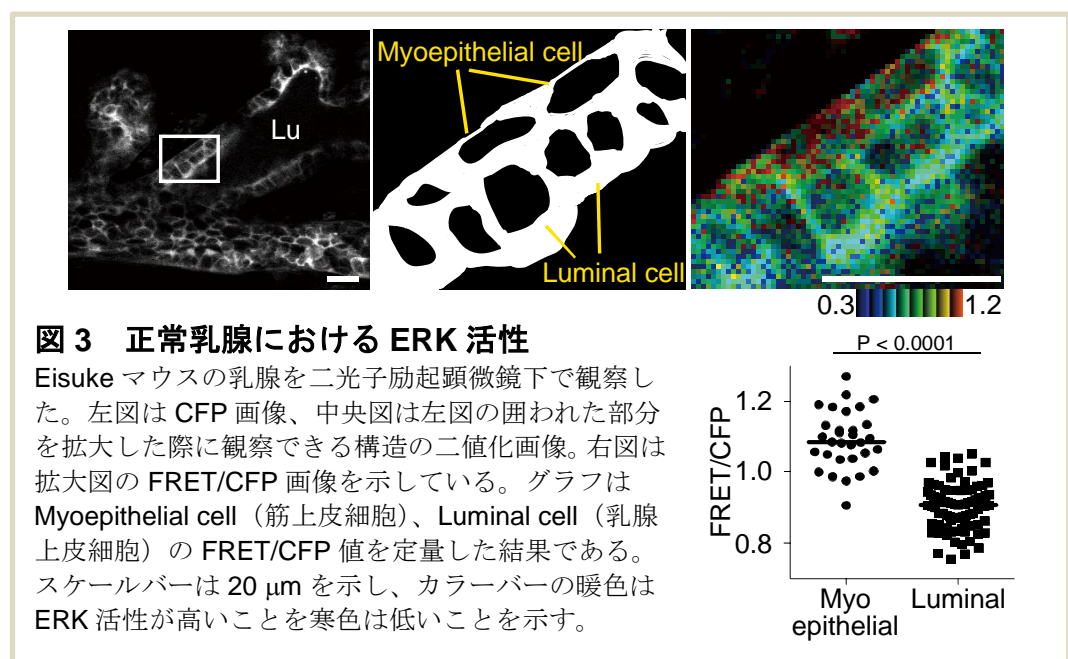
$X_i$  は細胞  $i$  における FRET/CFP 値、 $\langle X \rangle$  は FRET/CFP の平均値、 $N$  は細胞数、 $r_{ij}$  は細胞  $i$  と細胞  $j$  の距離をそれぞれ示す。重みは細胞  $i$  と細胞  $j$  の距離に反比例する。

## 第三章 結果

### 3.1 マウス HER2 陽性乳がんにおいて ERK 活性は不均一である。

マウス乳がんにおける ERK の活性を調べるために、筆者は HER2 陽性乳がんモデル MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスと ERK バイオセンサーを発現する EKAREV<sup>+/+</sup>マウスの交配を行った。EKAREV<sup>+/+</sup>マウスにおいて、組織の ERK 活性は FRET/CFP 画像で算出される。交配して得た EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスは MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスと同じ大きさに成長し、MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスと同様の頻度で乳がんを形成し、同様の組織学的特徴を有する乳腺上皮がんを発生した。正常乳腺細胞における ERK 活性を調べるために、EKAREV<sup>+/+</sup>マウスの第 4 乳腺を露出し、二光子励起顕微鏡下で乳腺を観察した。EKAREV バイオセンサーは筋上皮と乳腺上皮の両方に発現しており、ERK 活性は乳腺上皮細胞よりも筋上皮細胞で高かった (図 3)。

EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスは誕生から 24 週以降で原発性乳がん (Passage 0, P0) を発生する。まず乳がん細胞の自家蛍光の程度を検討するため、EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスと MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスの乳がん組織を同一条件で観察した (図 4A)。取得した画像の蛍光強度を測定した所、自家蛍光は



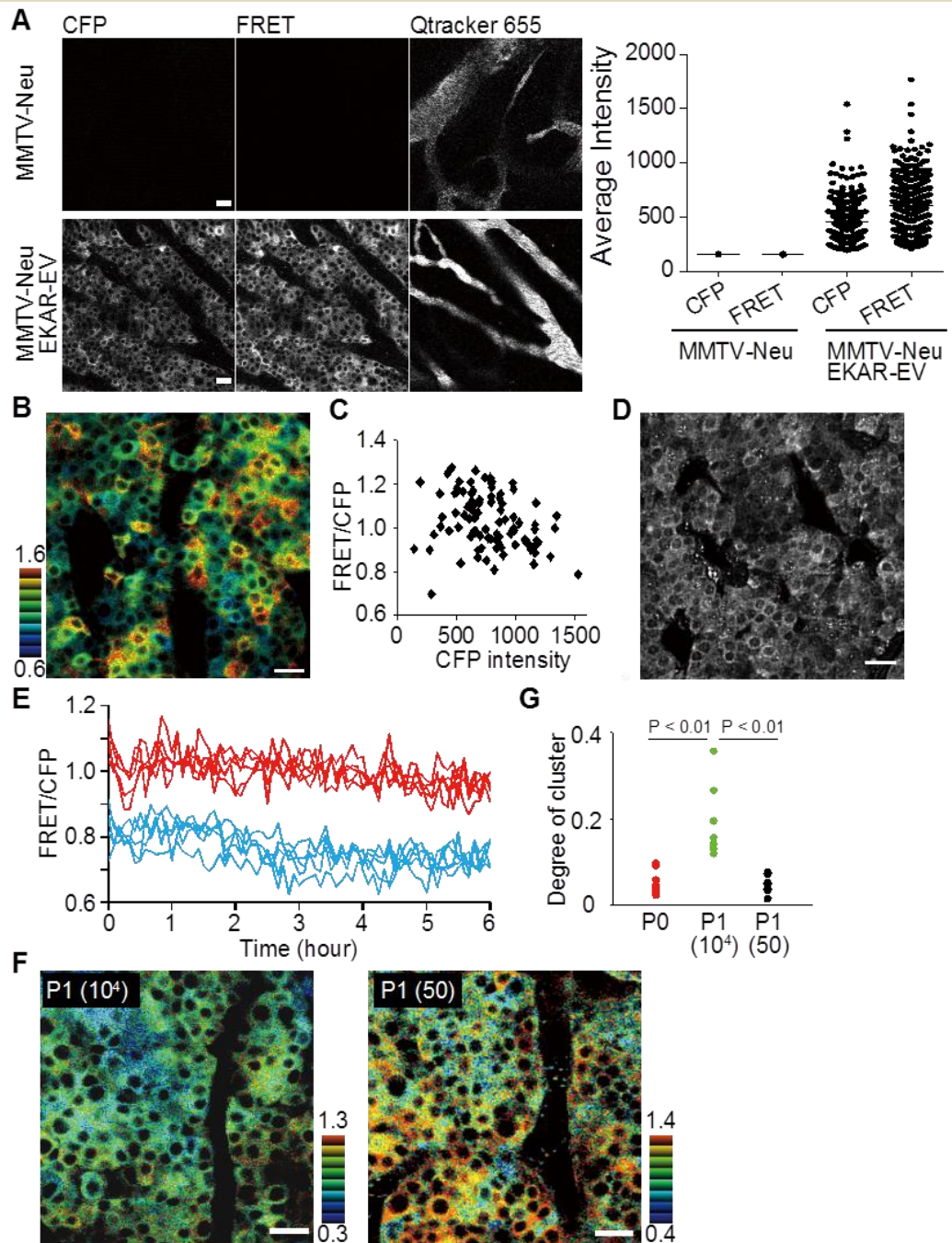
バイオセンサーの蛍光に比べ顕著に低かった。この結果より、乳がん観察において自家蛍光は FRET の算出に影響を与えないとして更なる実験を進めた。

EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスにおける原発性乳がんを二光子励起顕微鏡で観察した。乳がん組織を形成する個々のがん細胞は多様な ERK 活性を示し、全体として ERK の活性分布は不均一であった (図 4B)。FRET のシグナルとバイオセンサーの発現に相関はなかったことから、FRET 値の多様性はバイオセンサーの蛍光強度の多様性ではなく ERK 活性の多様性を反映していることがわかった (図 4C)。ここで見られた ERK 活性の不均一性は免疫染色でも同様に観察された (図 4D)。

この不均一な ERK 活性が一時的なノイズによるものなのか細胞集団ノイズによるものなのかを調べるため、乳がん細胞の ERK 活性を 6 時間生体イメージングした (図 4E)。全体の観察を通して細胞全体の平均値と比較すると多くの細胞において ERK の活性は顕著には変化しなかった。このことから、個々のがん細胞は安定なメカニズムにより一定の値の ERK 活性を保っていることが示唆された。

原発性乳がん細胞 (P0) 10<sup>4</sup> 個を同系の FVB マウスに同所移植すると、移植乳がん{Passage 1, P1 (10<sup>4</sup>)}が約一ヶ月で発生する。驚くべきことにこの P1 (10<sup>4</sup>) 乳がんの ERK 活性を観察すると P0 で見られたような不均一な活性は見られなかった (図 4F)。この活性分布差の根底にあるメカニズムを解明するため、50 個の原発性乳がん細胞を同所移植した。移植した細胞が識別可能な乳がん P1

(50) を形成するまで三カ月を要し、この乳がんにおいて ERK 活性は P0 同様不均一であった (図 4F)。クラスター解析を用い YFP/CFP 値のクラスター形成度を定量した所、P0 と P1 (50) はほとんどクラスターを形成していなかった (図 4G)。このことは、10<sup>4</sup> 個の細胞からスタートした場合と、50 個からスタ



**図4 乳がんのERK活性**

A. MMTV-Neu マウス、EKAR-EV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスに発生した原発性乳がんを二光子励起顕微鏡下で観察し、自家蛍光を検討した。B～E. EKAR-EV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスに発生した原発性乳がんを(B)二光子励起顕微鏡下で観察し、FRET/CFP画像を作製した。(C)二光子励起顕微鏡下で観察し、CFP蛍光(X軸)とFRET/CFP値(Y軸)の相関を検討した。(D)リン酸化ERK抗体を用いて免疫染色した。(E)二光子励起顕微鏡下で継時観察し、FRET/CFP値の定量を行った50細胞の内、上下5細胞のFRET/CFP値の変化をグラフに示した。(F)  $10^4$ 、50細胞を移植して形成した移植乳がん(P1)を二光子励起顕微鏡下で観察し、FRET/CFP画像を作製した。(G) B、Fの画像をもとにFRET/CFP値のクラスター解析を行った。{P0: N = 9, P1 ( $10^4$ ): N = 9, P1 (50): N = 7} スケールバーは20  $\mu$ mを示し、カラーバーの暖色はERK活性が高いことを寒色は低いことを示す。

ートした場合では細胞間の ERK 活性の分布が異なることを示唆している。

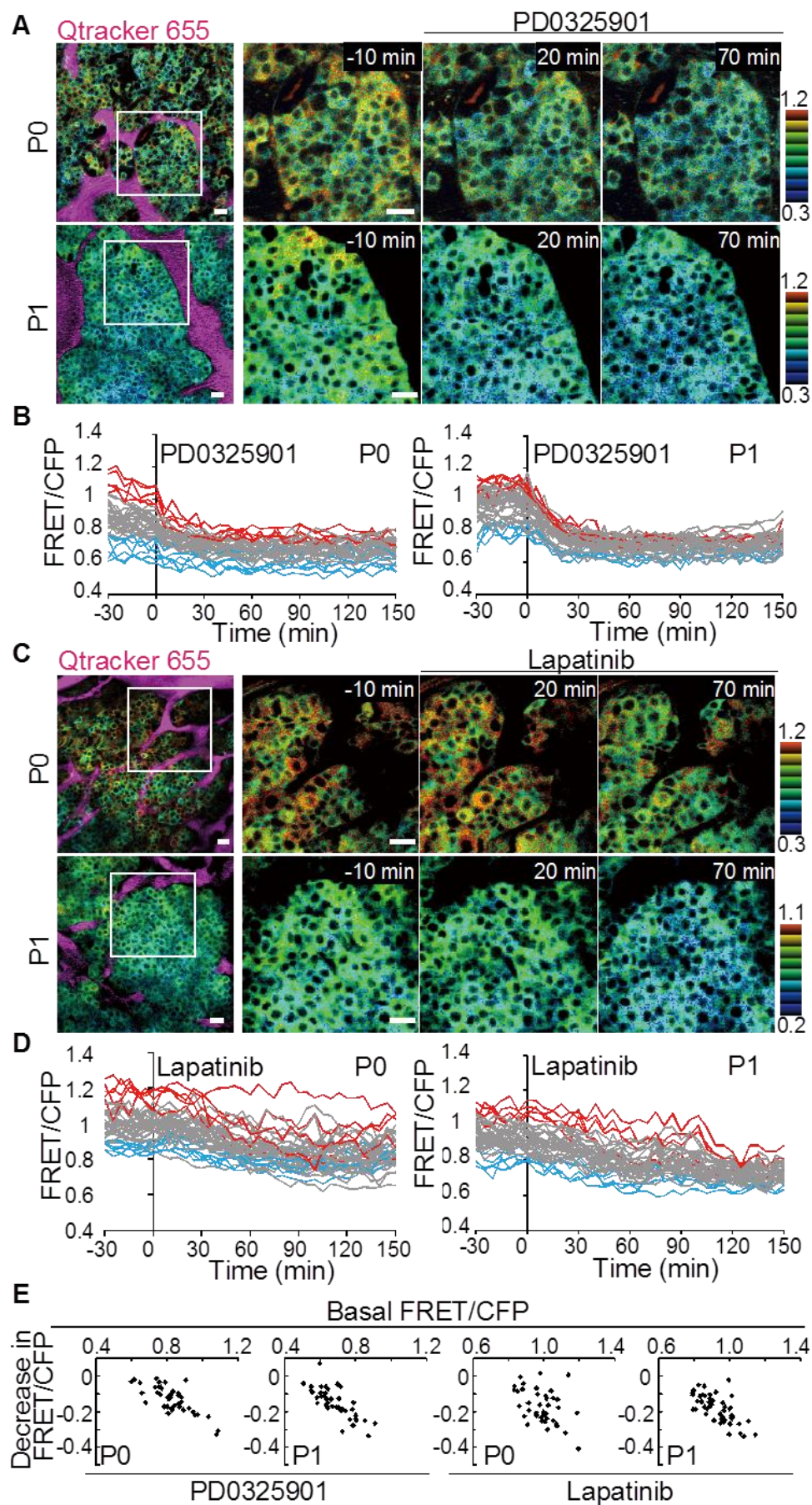
### 3.2 MEK 阻害剤の影響は ERK 活性の高い細胞で顕著である。

P0 乳がん、P1 (10<sup>4</sup>) 乳がんにおいて ERK の活性分布が異なったことから、分布の差がどのような生物学的な意義を持つのかに興味を持った。これを検討するため、P0、P1 乳がんを発生した EKAREV<sup>+/+</sup>/MMTV-Neu<sup>+/+</sup>マウスに阻害剤を投与し二光子励起顕微鏡下でがん細胞の ERK 活性変化を観察した。阻害剤と同時に Qtracker 655 を注入し、血管造影された時点を阻害剤到達点 0 分とした (図 5A、C 左)。MEK 阻害剤である PD0325901 を静脈注すると、P0、P1 両方の乳がん即座に ERK 活性が抑制された (図 5A、B)。血管近傍のがん細胞と血管から離れたがん細胞の間で PD0325901 に対する反応の差は見られなかった。PD0325901 投与後の ERK 活性の低下は定常状態の ERK 活性が高い細胞で大きく、低い細胞では低かった (図 5E)。EGFR (epidermal growth factor) と HER2 の阻害剤であるラパチニブを投与すると、P0、P1 両方の乳がん即座に ERK 活性が低下した (図 5C、D)。PD0325901 投与時と同様、P0 乳がんの ERK 活性の低い細胞においてはラパチニブ投与後もほとんど ERK 活性が低下しなかった (図 5E)。in vivo で観察された「ERK 活性が低下し始めるまでの時間差」が PD0325901 とラパチニブの薬物動態の差によるものなのかを検討するため、in vitro の系で検証した。原発性乳がんから乳

#### 図 5 阻害剤処理による ERK 活性の変化

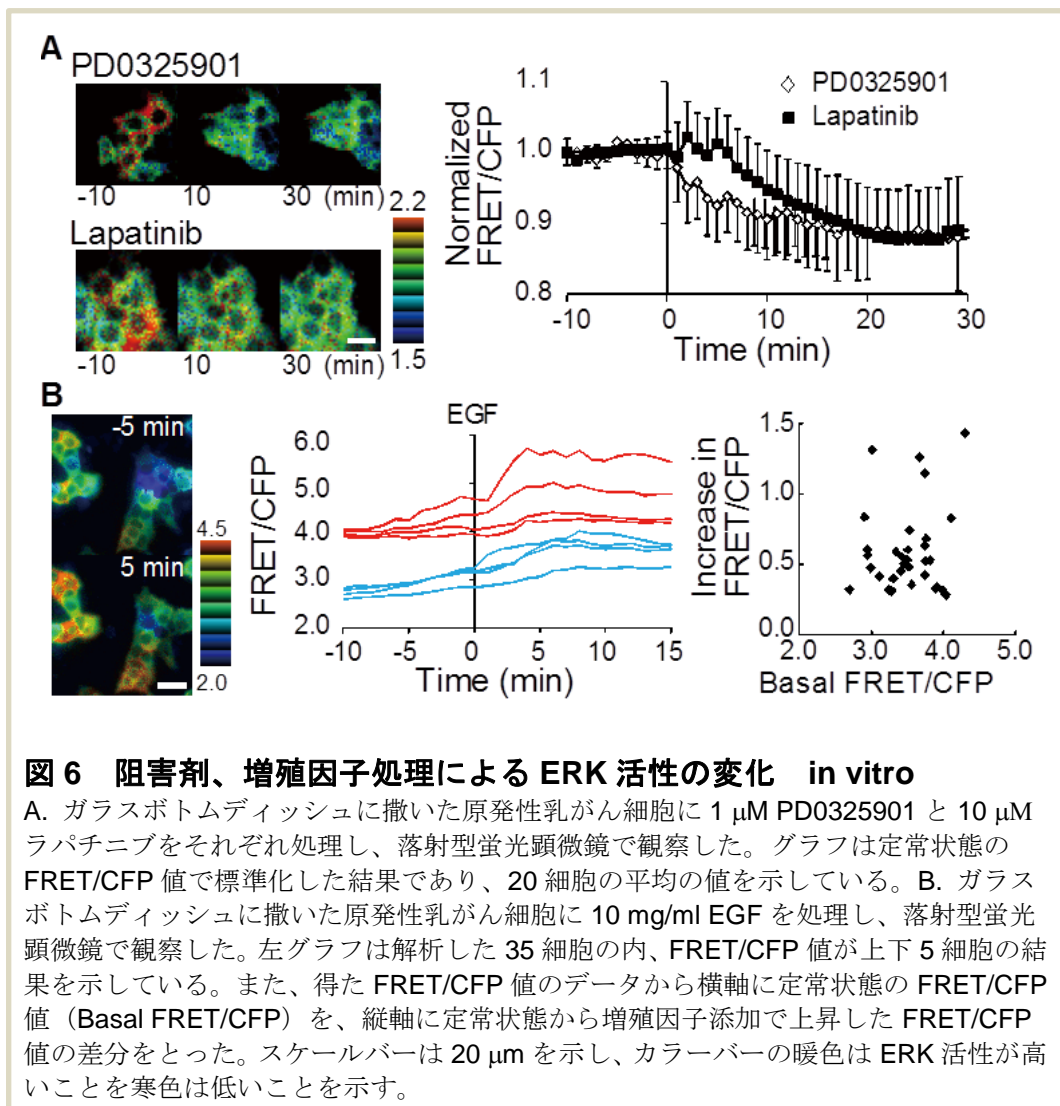
A、C. 5 mg/kg MEK 阻害剤 (PD0325901) もしくは 50 mg/kg ラパチニブと Qtracker655 を静脈注し、P0、P1 (10<sup>4</sup>) 腫瘍におけるがん細胞の ERK 活性変化を二光子励起顕微鏡下で観察した。左図は FRET/CFP 画像と Qtracker (マゼンタ) 画像を重ね合わせている。右画像は左図の四角で囲まれた領域を拡大し、FRET/CFP 値の経時変化を示している。B、D. A もしくは C の画像から FRET/CFP 値の変化を数値化した。各線は一細胞の変化を示す (N = 40)。E. A もしくは C の画像から得た FRET/CFP 値のデータから横軸に定常状態の FRET/CFP 値 (Basal FRET/CFP) を、縦軸に定常状態から阻害剤添加で低下した FRET/CFP 値の差分をとった。スケールバーは 20 μm を示し、カラーバーの暖色は ERK 活性が高いことを寒色は低いことを示す。





がん細胞を単離し、落射型蛍光顕微鏡下でタイムラプスイメージングを行った。

in vivo の観察結果と同様、PD0325901 を処理した細胞は即座に ERK 活性を低下させるのに比べ、ラパチニブを処理した細胞は処理後 5 分から ERK 活性を低下させた (図 6A)。また同様に、ERK 活性の高い細胞は低い細胞に比べ大きく ERK 活性を低下した。さらに増殖刺激に対する効果を検証するため、原発性乳がんから単離したがん細胞に上皮成長因子 (EGF) の処理を行い落射型蛍光顕微鏡下で ERK 活性の変化を観察した。阻害剤に対する反応とは対照的に、定常状態の ERK 活性と EGF 応答性の活性上昇の間には相関は見られなかった (図 6B)。これらの結果から不均一な ERK 活性は抗がん剤に対する感受性の差をも



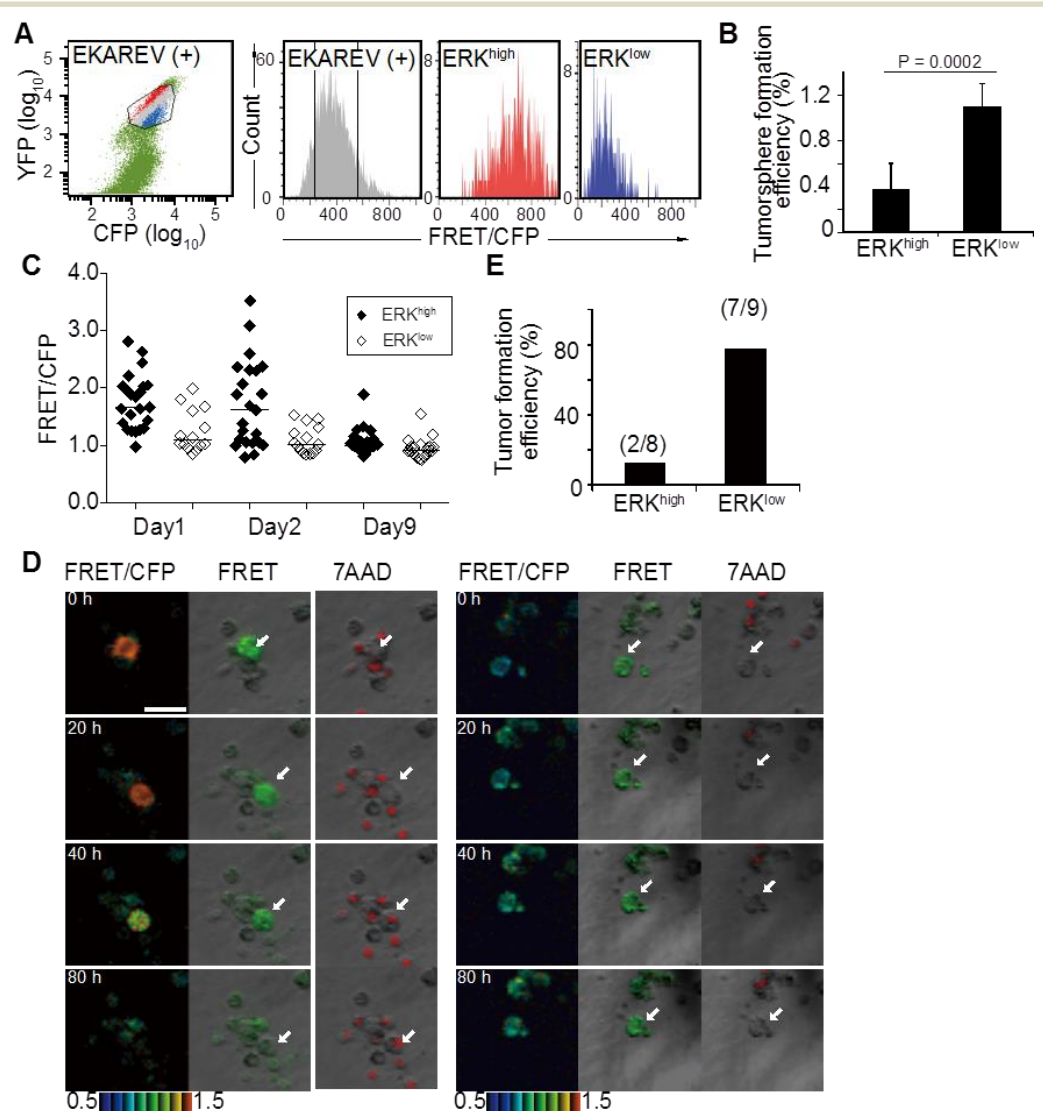
**図 6 阻害剤、増殖因子処理による ERK 活性の変化 in vitro**

A. ガラスボトムディッシュに撒いた原発性乳がん細胞に 1  $\mu$ M PD0325901 と 10  $\mu$ M ラパチニブをそれぞれ処理し、落射型蛍光顕微鏡で観察した。グラフは定常状態の FRET/CFP 値で標準化した結果であり、20 細胞の平均の値を示している。B. ガラスボトムディッシュに撒いた原発性乳がん細胞に 10 mg/ml EGF を処理し、落射型蛍光顕微鏡で観察した。左グラフは解析した 35 細胞の内、FRET/CFP 値が上下 5 細胞の結果を示している。また、得た FRET/CFP 値のデータから横軸に定常状態の FRET/CFP 値 (Basal FRET/CFP) を、縦軸に定常状態から増殖因子添加で上昇した FRET/CFP 値の差分をとった。スケールバーは 20  $\mu$ m を示し、カラーバーの暖色は ERK 活性が高いことを寒色は低いことを示す。

たらず可能性が示唆される。

### 3.3 ERK 活性の高いがん細胞は tumorsphere 形成能が低く、がん幹細胞マーカーの発現が低い。

今までの結果から乳がん細胞における ERK 活性の不均一性が何らかの役割を持つ可能性が示唆された。ERK の活性差がもつ生物学的意義を解明するため、ERK 活性で細胞を分取し特性を検証することにした (図 7A)。分取してきた  $ERK^{high}$ 、 $ERK^{low}$  細胞を用いて幹細胞検定である tumorsphere アッセイを行った。実験開始から二週間の時点で形成された tumorsphere 能を計測すると、 $ERK^{high}$  細胞の tumorsphere 形成能は  $ERK^{low}$  細胞に比べ有意に低かった (図 7B)。この原因を探るため、 $ERK^{high}$ 、 $ERK^{low}$  細胞をマトリゲルに撒きボックス型共焦点顕微鏡で 1 日、2 日、9 日経過時点の観察を行った。 $ERK^{high}$  分画の ERK 活性の高い細胞は日を追うごとに減少し、9 日目には  $ERK^{low}$  細胞と同じ活性を示す細胞のみが残った (図 7C)。さらに詳しく検討するために未ソートの乳がん細胞をマトリゲル上に撒き、培地中に 7AAD を加えて  $CO_2$  インキュベータ付属の共焦点顕微鏡で長時間観察した。ERK 活性の高い細胞は観察開始から 3 日で 7AAD 陽性となり、死亡していった (図 7D)。この結果から  $ERK^{high}$  細胞の tumorsphere 形成能が  $ERK^{low}$  細胞に比べ低い理由は  $ERK^{high}$  細胞が脆弱であるためと推測される。さらに  $ERK^{high}$  と  $ERK^{low}$  細胞について、がん形成能を検討した。50 個の  $ERK^{high}$ 、 $ERK^{low}$  細胞を同系マウスに同所移植し、三カ月後にがん形成を判定した (図 7E)。tumorsphere アッセイの結果同様に  $ERK^{low}$  細胞を移植したマウスに比べ、 $ERK^{high}$  細胞を移植したマウスの方はがん形成率が低かった。tumorsphere アッセイやがん形成実験はがん幹細胞を調べるために用いられることから、これらの結果は高い ERK 活性が乳がん細胞の幹細胞性を抑制することを示唆する。



**図 7 ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> 細胞分画の特性**

A. EKAR-EV/MMTV-Neu マウスから単離した原発性がん細胞を FACS Aria (BD) で FRET/CFP 値に基づき上下 10%の細胞分画を ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> として分取した。左ヒストグラムはバイオセンサーを発現する細胞の FRET/CFP 値を示し、中央、右ヒストグラムは ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> で分取した細胞を再解析したときの FRET/CFP 値である。

B. 分取してきた ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> 細胞を用いて tumorsphere アッセイを行った (N = 3)。

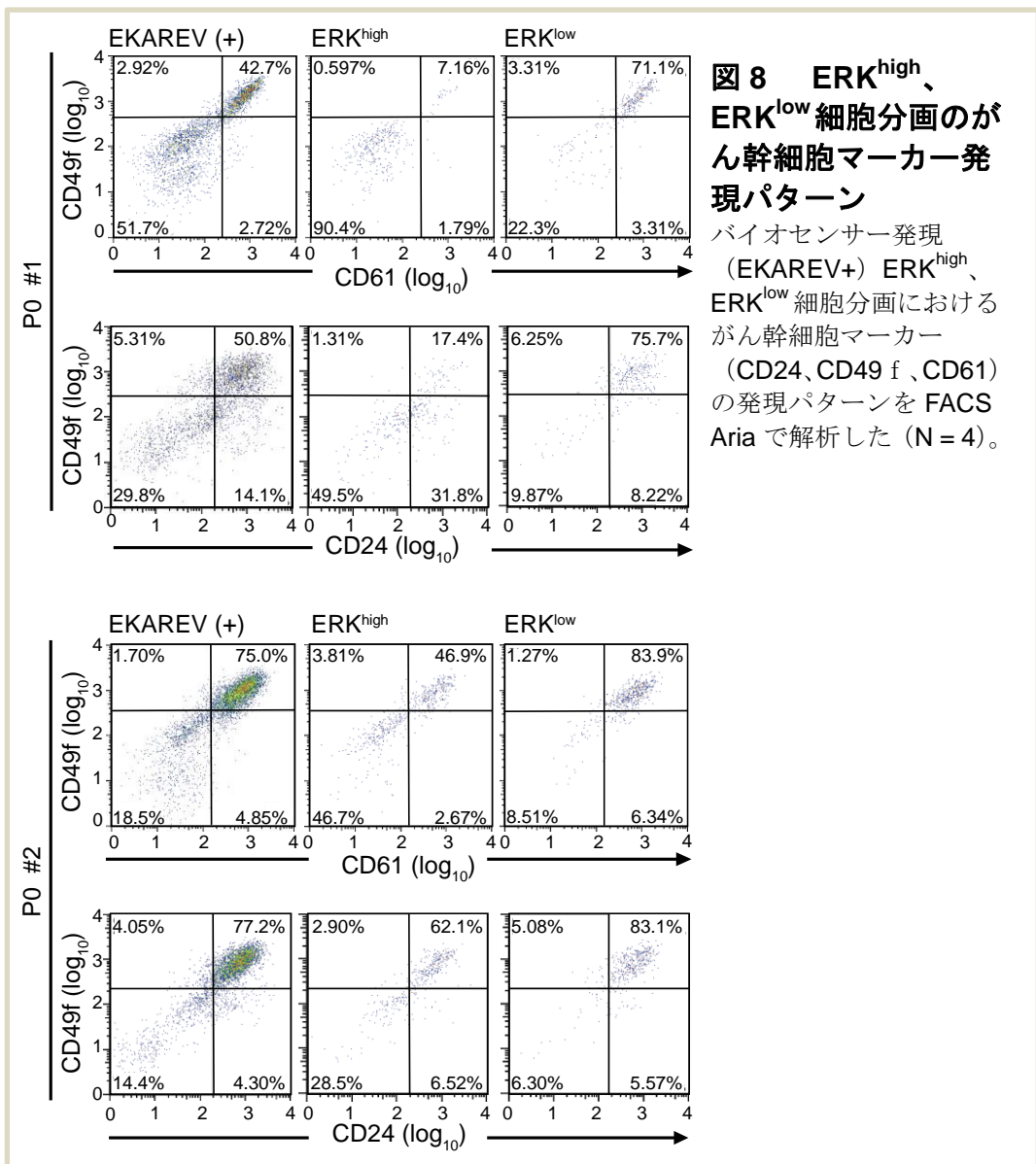
C. 分取してきた ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> 細胞をマトリゲル中に撒き、インキュベータ型共焦点顕微鏡 Fv10i で FRET/CFP 値の変化を分取後 1、2、9 日後観察した。p 値は対応のない t 検定により算出した。

D. 原発性がん細胞をマトリゲル上に撒き、培地中に 7AAD を加え、共焦点顕微鏡 FV1000 で観察した。矢印は同一細胞を示し、スケールバーは 20 μm を示す。

E. 分取してきた ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> 細胞を 50 細胞ずつ同系マウスに同所移植し、乳がん形成能を調べた。

ERK 活性が高いことが幹細胞性を抑制するという可能性について検討するために ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> 細胞のがん幹細胞マーカー発現を調べた。過去の報告同様に、原発性乳がん細胞の大部分が CD49f、CD24、CD61 という三種類の幹細胞



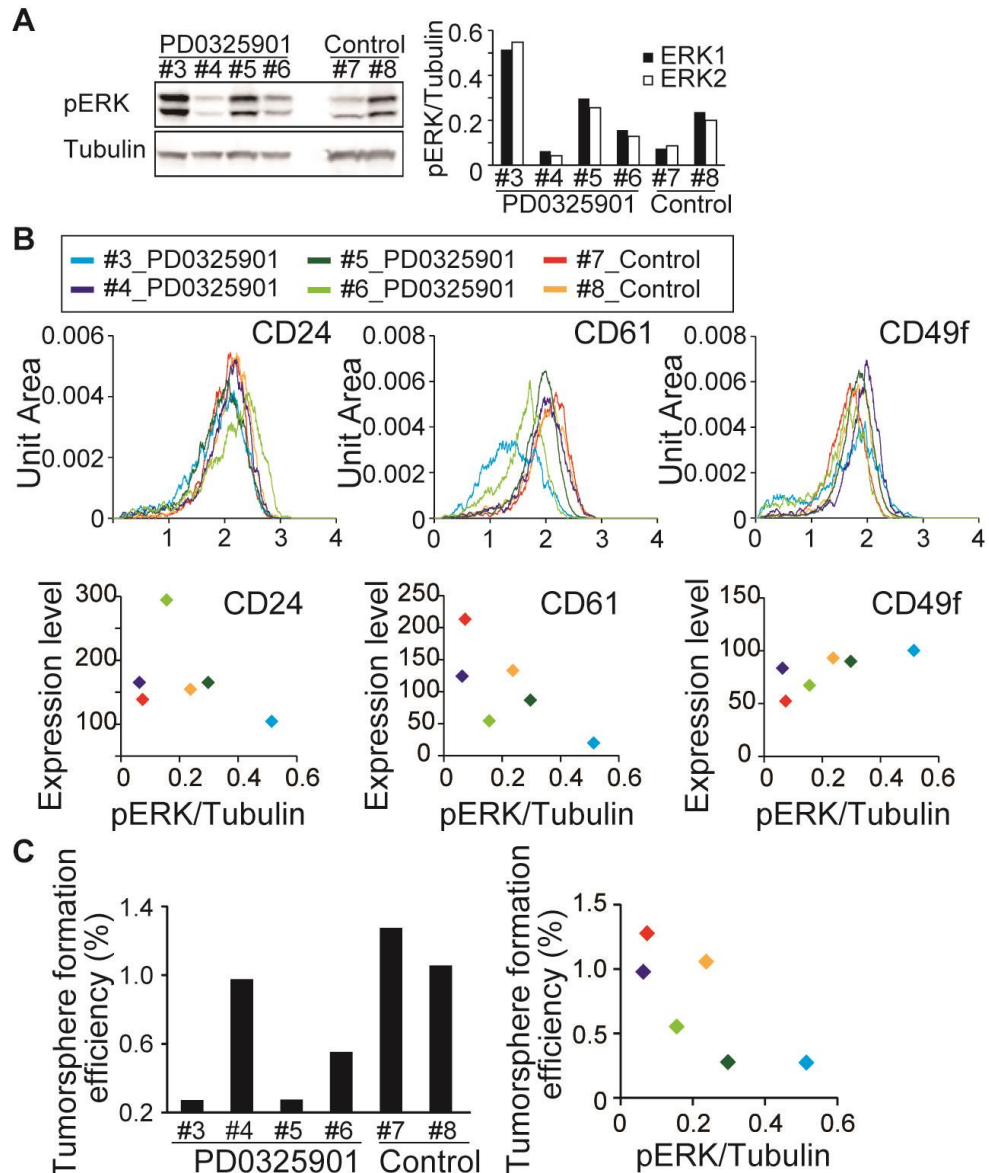


**図8 ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup>細胞分画のがん幹細胞マーカー発現パターン**

バイオセンサー発現 (EKAREV+) ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup>細胞分画におけるがん幹細胞マーカー (CD24、CD49f、CD61) の発現パターンを FACS Aria で解析した (N = 4)。

マーカーを発現している (図 8)。ERK<sup>high</sup>細胞においては CD61<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画、CD24<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画の細胞群が顕著に増加しており、高い ERK 活性が乳がん細胞の幹細胞性を抑制していることが示唆された。CD61<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画、CD24<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画に含まれる細胞の割合は個体間で異なったが、複数回 (N = 3) にわたり ERK<sup>high</sup>細胞において CD61<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画、CD24<sup>+</sup>/CD49f<sup>+</sup>分画の細胞群が顕著に増加するという傾向が見られた。

最後に ERK 活性を変化させることで乳がんの幹細胞特性を制御できるか検討した。ERK 活性を低下させるために、原発性乳がんを発生した MMTV-Neu<sup>+/+</sup>



**図9 がん幹細胞性と ERK 活性**

A. 1 週間 50mg/kg MEK 阻害剤を投与したマウスとしないマウスから得た原発性乳がん細胞の一部をウェスタンブロットした。左図はバンドを示し、右グラフは定量結果である。B. 各乳がんサンプルにおけるがん幹細胞マーカーCD24、CD49f、Cd61の発現レベルを FACS で解析した。ヒストグラムは各ヒストグラムの総面積が 1 となるよう描画している。下図は ERK 活性（横軸）とマーカー発現レベルの最頻値（Expression level）（縦軸）の相関関係を示している。C. 棒グラフは各乳がんサンプルにおける tumorsphere 形成能を示しており、右図は ERK 活性（横軸）と tumorsphere 形成能（縦軸）の相関関係を示している。

マウスに MEK 阻害剤 PD0325901 を一週間経口投与した。一週間後採取した乳

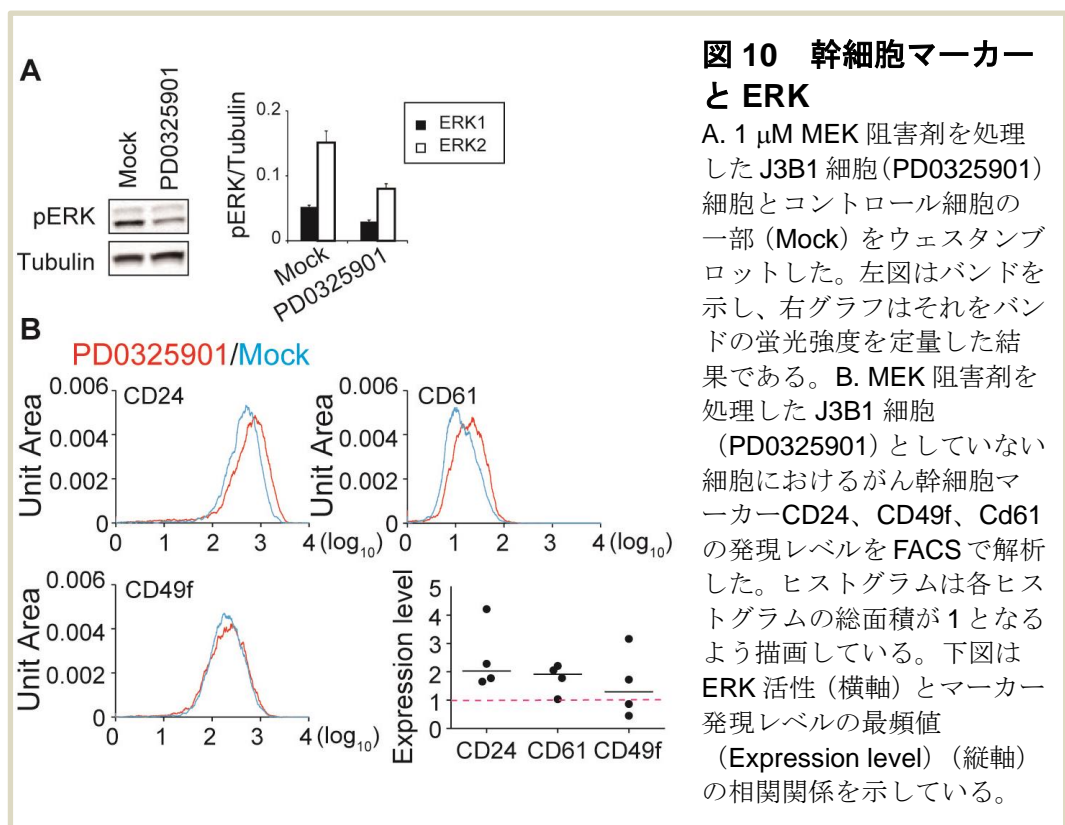
がん組織の一部を用いて ERK のリン酸化レベルを定量した所、予想に反し

PD0325901 投与群において ERK リン酸化レベルは低下しなかった（図 9A）。

しかしながら各乳がんにおけるがん幹細胞マーカーの発現レベル、tumorsphere

形成能を調べると、個々の乳がんの ERK 活性は CD24、CD61 の発現レベルと逆相関しているだけでなく、tumorsphere 形成能にも逆相関していた (図 9B、C)。

in vivo における MEK 阻害剤の実験は予期した結果を得られなかったため、マウス正常乳腺細胞株 Eph4 由来の細胞株 J3B1 に PD0325901 処理し ERK 活性を抑制した。二日間培地中に PD0325901 を添加した細胞とコントロール細胞を用い、一部の細胞で ERK のリン酸化レベルを定量した。PD0325901 処理細胞ではコントロールに比べ ERK 活性が低下していることが確認できた (図 10A)。この細胞を用いて幹細胞マーカーの発現レベルを調べた所、CD24、CD61 については MEK 阻害剤処理細胞で発現レベルが上昇していたが CD49f については差が見られなかった (図 10B)。以上から、マウス乳腺の幹細胞マーカーの内 CD24、CD61 は ERK の活性によって制御されるが CD49f は制御されないことが明らかになった。これらの結果は高い ERK 活性が MMTV-Neu 乳がんモデル



マウスにおけるがん幹細胞の特性を抑制するという考えを支持するものであった。



## 第四章 考察

二光子励起顕微鏡が生体イメージングに威力を発揮することはすでによく知られている[27, 41]。しかしこれらの研究においては組織特異的に蛍光タンパク質を発現させることで特定の分子の分布は観察できるものの、分子活性を追うことはできていなかった。本研究で用いた **FRET** マウスは生体内における細胞の分子活性を観察することを可能とし、**x-y-z** の三次元情報に加え時間、分子活性と五次元の情報を研究者に提供できる[30, 31]。本研究において筆者はこのマウスから得た生体イメージング観察結果を基に、種々の **in vitro** の実験系を用いることにより **ERK** の活性ががんにおける幹細胞性を制御することを明らかにした。

### **FRET バイオセンサー発現遺伝子改変マウス（FRET マウス）の有用性**

現在筆者の所属する研究室では **ERK**、**PKA** を始めとし種々の **FRET** バイオセンサーを発現する **FRET** マウスを保有している。これら **FRET** マウスはバイオセンサーを **CAG** プロモーター下で発現するため、皮膚や筋肉など幅広い臓器でバイオセンサーを発現している[30]。乳腺においても図 3 で示したように、乳腺を構成する乳腺上皮細胞やそれを支持する筋上皮細胞でバイオセンサーが発現していた。しかしプロゲステロンレセプター陽性細胞においてはバイオセンサーを発現していないことを確認しており、**CAG** プロモーター下ではバイオセンサーの発現が十分でない細胞も存在する。また、逆にほぼ全ての細胞でバイオセンサーが発現しているため、観察時に一つ一つの細胞同定が困難という問題もある。例えば乳腺特異的プロモーターである **MMTV** プロモーター下でバイオセンサーを発現させれば乳腺上皮細胞でのみバイオセンサーが発現するので、観察している細胞が乳腺上皮細胞であることを簡単に判別することが可能である。さらに今回の実験手技で必要となった磁気による細胞分画を行う必要がなくなり、細胞の単離がより容易になるなどのメリットもある。今後標的細胞の

活性変化を解析するためには、抗体を用いて細胞を染色したり、組織特異的にバイオセンサーを発現させたりすることが必要となってくるだろう。

### 原発性乳がん P0 と移植乳がん P1 の ERK 活性分布の違い

本研究において、研究の律速段階となった「乳がん形成に長期間を要する」という問題を改善するため原発性乳がん細胞  $10^4$  細胞を移植し、同系マウスに移植乳がん P1 ( $10^4$ ) を形成させた。しかし移植乳がん P1 ( $10^4$ ) における ERK 活性を観察した所、ERK の活性分布は P0 と異なり均一であった (図 4F)。一方で移植乳がん P1 (50) を観察した所、ERK の活性分布は P0 同様不均一であった (図 4F)。P1 ( $10^4$ ) の形成に一ヶ月、P1 (50) の形成に三カ月かかることから、細胞増殖能がこの不均一性の原因ではないかと考え、増殖細胞を EdU で染色し増殖細胞数を計測した。結果は示していないが、P0 と P1 ( $10^4$ ) 間で細胞増殖能に差は見られなかった。現時点では明確な回答を得ていないが、ERK の活性分布差は細胞増殖ではなく乳がんが形成されてからの時間に寄与するものなのではないかと推察している。この原因を解明するためには、乳がんにおける ERK 活性の継時変化を長期的に検討することが必要である。現在イメージング法では最長 8 時間の観察が可能であるが、一ヶ月単位の長期観察を行うためにはイメージングウインドウを用いる必要がある。イメージングウインドウを用いたマウスの長期間観察は脳研究分野で行われており、移植乳がん研究においても報告されている[42, 43]。筆者も同様にイメージングウインドウを作製したが、炎症やマウスによる噛みつきなどが原因で乳腺、乳がんの観察には至らなかった。生体イメージングの利点の一つとして同一のマウスを何度も観察することができることが挙げられる。イメージングウインドウによる長期観察法が確立すれば、がんの形成段階 (初期、後期) における分子活性の変化を観察することが可能となるため、今後もこの手法の確立に取り組む必要がある。

## in vivo FRET イメージングの有用性

二光子励起顕微鏡を用いた in vivo FRET イメージングは薬物動態の検定に有用である。筆者の所属する研究室では FRET マウスを用い好中球の ERK 活性に対する MEK 阻害剤の効果や筋や神経の PKA 活性に対するサイクリック AMP アナログの効果などをイメージングすることに成功している[30]。さらに最近では Src 活性検出用の FRET バイオセンサーを発現した膵がん細胞を皮下移植し、がん組織でダサチニブの Src 阻害効果も観察されている[44]。

本研究では ERK 活性が薬剤反応に関与するかを検討するため、治験段階の MEK 阻害剤 PD0325901[45]と臨床で用いられている EGFR、HER2 阻害剤ラパチニブを用いた[46]。移植乳がん P1 ( $10^4$ ) に比べ、原発性乳がん P0 は顕著に不均一な ERK 活性分布を示した (図 4F)。阻害剤の静脈注により ERK 活性の高い細胞は低い細胞に比べ、激しく ERK 活性を低下させた (図 5)。この結果から、HER2/Neu-ERK 経路の阻害剤は ERK 活性の低い細胞にはあまり効果がないのではないかと推測している。この推察を立証するために in vitro において阻害剤抵抗性を検討したが、阻害剤非添加条件においても ERK 活性の高い細胞が死んでいったため、本研究においては結論を出すことができなかった。今後イメージングウインドウによるがん観察に成功すれば、阻害剤による個々の乳がん細胞の ERK 活性変化を長期間にわたり観察することが可能となる。これが実現すれば、in vivo においても ERK 活性の高い細胞が死にやすいのか、阻害剤に対して ERK 活性の低い細胞が抵抗性を示すのかという疑問にも答えられるのではないかと期待している。

in vivo FRET イメージングの観察結果を検討する際、筆者はがん細胞と血管の位置関係に着目して解析を行ったが、今回の結果では血管とがん細胞の位置関係はがん細胞の阻害剤に対する反応に影響を与えなかった。おそらく阻害剤

の到達点を明確にするため血管が豊富に存在する部位を好んで観察したこと、観察のインターバルが 5 分と長かったことが原因ではないかと考えている。血管の存在しない部位を観察することや 30 秒単位などの短いインターバルで画像取得することにより差を観察できるのではないかと期待している。

## ERK と乳がん幹細胞性の制御

マーカーとして用いた CD24、CD49f、CD61 はもともとマウス正常乳腺の幹細胞もしくは乳腺上皮前駆細胞を同定するために用いられた細胞表面抗原である[47-50]。これらのマーカーは MMTV-Neu マウスにおける乳がん幹細胞の同定にも用いられている。Liu らは CD24、CD49f 陽性細胞群が乳がんにおいて劇的に増加すること、この細胞群が tumorsphere を多く形成することを示した[36]。CD61 のがん幹細胞性マーカーとしての有用性は Vaillant らによって一度は否定されたが[51]、Lo らは CD61<sup>high</sup>CD49f<sup>high</sup> 細胞分画が tumorsphere 形成能、移植乳がん形成能が高く、パクリタキセルやドキソルビシンへの抵抗性を示すことを明らかにし、がん幹細胞マーカーとしての CD61 の有用性を示した[35]。

筆者は ERK の活性が高い細胞は低い細胞に比べ幹細胞性を失うこと、外的に ERK 活性を抑制することで幹細胞マーカー CD24、CD61 の発現が上昇することを本研究において示した。CD49f に関しては MEK 阻害剤添加実験で発現レベルに有意な差は観察されなかった。ERK<sup>high</sup>、ERK<sup>low</sup> で細胞分取した際に CD49f についても差が観察されたことから、CD49f の発現は短期間の ERK 活性制御では観察できない二次的な要因によって制御されているのではないかと推察している。

本研究による結果を「ERK の活性が高いことで幹細胞性が失われる」と表現するか「ERK の活性が低いことが幹細胞性を保つことに必要である」と理解するかは議論の残るところである。ERK 活性を抑制すると幹細胞マーカーの発現

が強くなるという結果（図 10）は後者の表現を支持するが、MMTV-Neu マウスから得た乳がん細胞のほとんどが CD24、CD49f、CD61 を発現していることから、本研究では「ERK 活性の高い細胞が幹細胞性を喪失する」と表現することとした。低い ERK 活性が幹細胞性の維持に必要であることはがん幹細胞研究では言及されていないが、マウス胚性幹（ES）細胞において ERK 活性の抑制状態が分化誘導シグナルの発生を抑制するために必要であるという報告がある [52]。本研究における結果も ES 細胞同様、ERK 活性が低く保たれていることが幹細胞性の維持に必要であることを示していると推察している。

ERK は乳がんにおいてがん幹細胞の増殖に重要な役割を果たすことが報告されている [5, 9, 10]。本研究の「ERK<sup>high</sup> 細胞が ERK<sup>low</sup> 細胞に比べ、がん原性が低い」とする結果は、一見これらの報告に反するよう見える。しかし過去の報告では ERK のがん原性を評価する際、がん遺伝子発現細胞（がん細胞）とコントロール細胞の比較を行い、がん細胞が平均して高い ERK 活性、高い増殖能、がん幹細胞に富むことを示している。本研究ではがん遺伝子 HER2/Neu を発現した同一の乳がん組織の中で検討を行っており、その中では ERK 活性の低い細胞ががん幹細胞性を持ち、ERK 活性の高い細胞が高い増殖能と脆弱性を持つのではないかと考えている。

### 抗がん剤としての MEK 阻害剤

本研究の成果は ERK 活性ががん細胞の幹細胞性と負に相関し、ERK 活性の抑制が幹細胞マーカーの発現上昇につながるとするものである。がん幹細胞ががんの再発をもたらすことを考慮すると、MEK 阻害剤の投与によりがん幹細胞が増加することは再発という意味において予後不良につながる。しかし本研究においてはがん細胞の増殖や浸潤、転移については検討しておらず、がんの悪性度という概念からいえばその検討なしに結論を出すことはできない。MEK 阻

害剤の投与ががん細胞の増殖を阻害することは今までの報告から明らかである[53]。著者は今回示した結果は **MEK** 阻害剤の増殖阻害効果を否定するものではなく、あくまで投与後の注意を喚起するものであると考えている。また今回得た知見が他マウスやヒト細胞を用いたモデルにおいても適応できるものであるかを検討する事も必要である。もし適応するとすれば、まず **MEK** 阻害剤を投与し増殖を止め、次に増加したがん幹細胞を死滅させる薬剤を投与する治療法を確立できるのではないかと期待している。

## 最後に

本研究において筆者は FRET マウスを用いて以下の 4 点を明らかにした。

- ・ MMTV-Neu マウスの形成する原発性乳がんは ERK の活性分布が不均一であること
- ・ ERK 活性の低い細胞は HER2/Neu-ERK 経路の阻害剤を加えても活性をほとんど低下させないこと
- ・ ERK 活性の高い細胞は幹細胞性が低く、脆弱であること
- ・ ERK 活性が幹細胞マーカー（CD24、CD61）の発現を制御すること

一方で、ERK 活性の不均一性を生み出すメカニズムや ERK<sup>high</sup> 細胞と ERK<sup>low</sup> 細胞の増殖能の比較など本研究において検討しきれなかった問題もある。

筆者は、生体を用いた *in vivo* の系と生体から単離したがん細胞を用いた *in vitro* の系を併用することで上記の結果を得た。乳線、乳がん分野は他組織分野に比較すると *in vivo*、*in vitro* の系が比較的充実している分野である。FRET マウスは生体における分子活性観察を可能とし、研究者に新たな知見を与えてくれる。しかしその根底にあるメカニズムを解析するためには *in vivo* の系と *in vitro* の系の両方を用いることが必要である。今後 FRET マウスを用いた *in vivo* FRET イメージングは広く普及するだろうが、それと同時に「見えたもの」を「見えただけ」にせず、「理解する」ための技術も身に付けていかななくてはならない。本研究成果がその一つの例になることを期待する。



## 謝辞

本研究ならびに論文を作成するにあたり、ご指導くださった松田道行教授、取得した画像をもとにクラスター解析を行ってくださった本田直樹准教授、顕微鏡観察の技術指導をしてくださった中正英二さん、動物実験の方法について助言くださった上岡裕治助教、実験やディスカッションにおいてご指導くださった清川悦子金沢医科大学教授、ならびに多くの助言を下された研究室の先生方、先輩方、技術員の方々に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuka Kumagai, Honda Naoki, Eiji Nakasyo, Yuji Kamioka, Etsuko Kiyokawa,  
Michiyuki Matsuda

Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of  
mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice  
Oncogene Accepted

## 参考文献

1. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(10): p. 755-68.
2. Zhou, B.B., et al., *Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(10): p. 806-23.
3. Magnifico, A., et al., *Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2010-21.
4. Korkaya, H., et al., *HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion*. Oncogene, 2008. **27**(47): p. 6120-30.
5. Chang, C.J., et al., *EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signaling*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 86-100.
6. Whyte, J., et al., *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(5): p. 209.
7. Guy CT, M.W., *Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(November): p. 10578-10582.
8. Ursini-Siegel, J., et al., *Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 389-97.
9. Jeselsohn, R., et al., *Cyclin D1 kinase activity is required for the*

- self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 65-76.
10. Izrailit, J., et al., *High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGFbeta pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(5): p. 1714-9.
  11. Mueller, H., et al., *Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients*. Int J Cancer, 2000. **89**(4): p. 384-8.
  12. McGlynn, L.M., et al., *Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1487-95.
  13. Bergqvist, J., et al., *Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor alpha are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen*. Eur J Cancer, 2006. **42**(8): p. 1104-12.
  14. Svensson, S., et al., *ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis*. Oncogene, 2005. **24**(27): p. 4370-9.
  15. Milde-Langosch, K., et al., *Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(12): p. 2206-15.
  16. Kunath, T., et al., *FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment*. Development, 2007. **134**(16): p. 2895-902.

17. Yu, F., et al., *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1109-23.
18. Dylla, S.J., et al., *Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2428.
19. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
20. Nakanishi, Y., et al., *Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine*. Nat Genet, 2013. **45**(1): p. 98-103.
21. 国立がん研究センターがん対策情報センター 最新がん統計. がん情報サービス, 2013.
22. 戸井政和, 乳がんレビュー. 2012: メディカルレビュー.
23. Kiyokawa, E., et al., *Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Forster Resonance Energy Transfer (FRET): Implications for signaling and pharmacology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011. **51**: p. 337-58.
24. Mochizuki, N., et al., *Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1065-8.
25. Miyawaki, A., et al., *Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 882-7.
26. Provenzano, P.P., et al., *Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer*. Am J Pathol, 2008. **173**(5): p. 1551-65.

27. Okada, T., et al., *Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e150.
28. Kumagai, Y., et al., *A genetically encoded Forster resonance energy transfer biosensor for two-photon excitation microscopy*. Anal Biochem, 2011. **413**(2): p. 192-9.
29. Komatsu, N., et al., *Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(23): p. 4647-56.
30. Kamioka, Y., et al., *Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors*. Cell Struct Funct, 2012. **37**(1): p. 65-73.
31. Goto, A., et al., *GDNF and endothelin 3 regulate migration of enteric neural crest-derived cells via protein kinase A and Rac1*. J Neurosci, 2013. **33**(11): p. 4901-12.
32. Cardiff, R.D. and N. Kenney, *A compendium of the mouse mammary tumor biologist: from the initial observations in the house mouse to the development of genetically engineered mice*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(6).
33. Lee, E.Y. and W.J. Muller, *Oncogenes and tumor suppressor genes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(10): p. a003236.
34. Liu, J.C., et al., *Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8671-81.
35. Lo, P.K., et al., *CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from*

*luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFbeta signaling.* Oncogene, 2011.

36. Liu JC, V.V., Bader GD, Deng T, Pusztai L, Symmans WF, Esteva FJ, Egan SE, Zacksenhaus E., *Seventeen-gene signature from enriched Her2/Neu mammary tumor-initiating cells predicts clinical outcome for human HER2+·ERα- breast cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2012. **109**(15): p. 5832-7.
37. Seddighzadeh, M., et al., *ERK signalling in metastatic human MDA-MB-231 breast carcinoma cells is adapted to obtain high urokinase expression and rapid cell proliferation.* Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(8): p. 649-54.
38. Ewald, A.J., Z. Werb, and M. Egeblad, *Dynamic, Long-Term In Vivo Imaging of Tumor-Stroma Interactions in Mouse Models of Breast Cancer Using Spinning-Disk Confocal Microscopy.* Cold Spring Harbor Protocols, 2011. **2011**(2): p. pdb.top97-pdb.top97.
39. Ewald, A.J., et al., *Collective Epithelial Migration and Cell Rearrangements Drive Mammary Branching Morphogenesis.* Dev Cell, 2008. **14**(4): p. 570-581.
40. Hira, R., et al., *Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement.* J Neurosci, 2013. **33**(4): p. 1377-90.
41. Kotani, M., et al., *Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques.* J Immunol, 2013. **190**(2): p. 605-12.
42. Kedrin, D., et al., *Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window.* Nat Methods, 2008. **5**(12): p. 1019-21.

43. Sidani, M., et al., *Probing the microenvironment of mammary tumors using multiphoton microscopy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2006. **11**(2): p. 151-63.
44. Nobis, M., et al., *Intravital FLIM-FRET imaging reveals dasatinib-induced spatial control of src in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4674-86.
45. Brown, A.P., et al., *Pharmacodynamic and toxicokinetic evaluation of the novel MEK inhibitor, PD0325901, in the rat following oral and intravenous administration*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **59**(5): p. 671-9.
46. Liu, L., et al., *Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6871-8.
47. Pece, S., et al., *Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content*. Cell, 2010. **140**(1): p. 62-73.
48. Stingl, J., et al., *Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells*. Nature, 2006. **439**(7079): p. 993-7.
49. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. Nature, 2006. **439**(7072): p. 84-8.
50. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 201-9.
51. Vaillant, F., et al., *The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7711-7.

52. Ying, Q.L., et al., *The ground state of embryonic stem cell self-renewal*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 519-23.
53. Henderson, Y.C., et al., *MEK Inhibitor PD0325901 Significantly Reduces the Growth of Papillary Thyroid Carcinoma Cells In vitro and In vivo*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(7): p. 1968-1976.